



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL

REVISÃO TAXONÔMICA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE
***PHRYNOPS GEOFFROANUS* (SCHWEIGGER, 1812)**
(TESTUDINES: CHELIDAE)

VINICIUS TADEU DE CARVALHO

MANAUS, AMAZONAS
2016

**REVISÃO TAXONÔMICA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE
PHRYNOPS GEOFFROANUS (SCHWEIGGER, 1812)
(TESTUDINES: CHELIDAE)**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CURSO DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL, BIONORTE, NA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO.

ORIENTADORA: DRA. IZENI PIRES FARIAS
CO-ORIENTADOR: DR. RICHARD C. VOGT

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C331r Carvalho, Vinicius Tadeu de
Revisão taxonômica e sistemática filogenética de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) / Vinicius Tadeu de Carvalho. 2016
124 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Izeni Pires Farias
Coorientador: Richard Carl Vogt
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Chelidae. 2. *Phrynops geoffroanus*. 3. mtDNA. 4. linhagens evolutivas. 5. diversidade genética. I. Farias, Izeni Pires II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

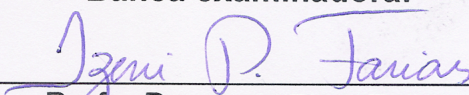
VINICIUS TADEU DE CARVALHO

REVISÃO TAXONÔMICA E SISTEMÁTICA FILOGÊNÉTICA DE *PHRYNOPS GEOFFROANUS* (SCHWEIGGER, 1812) (TESTUDINES: CHELIDAE)

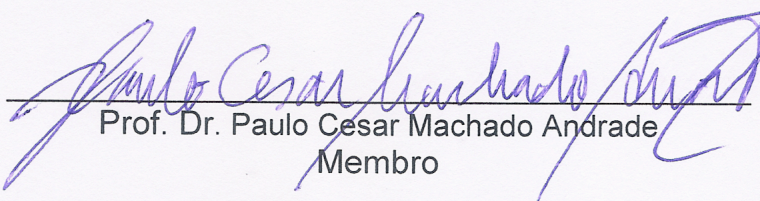
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, área de concentração em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): **Profa. Dra. Izeni Pires Farias**
Co-orientador (a): **Prof. Dr. Richard C. Vogt.**

Banca examinadora:



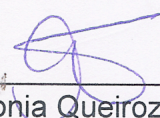
Profa. Dra. Izeni Pires Farias
Orientadora – Presidente da banca



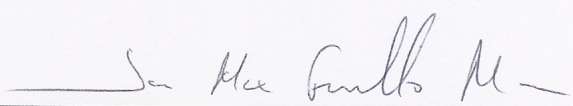
Prof. Dr. Paulo Cesar Machado Andrade
Membro



Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende
Membro



Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Membro



Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia
Membro

MANAUS –AMAZONAS
Dezembro/2016

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTA TESE AOS MEUS PAIS MARILUCE DE SOUZA CARVALHO, EDMUNDO SOUZA DE CARVALHO, MEUS IRMÃOS VICTOR E CRISTINA, AOS MEUS AVÓS JUSTINO E DIDI, AOS MEUS FILHOS, EDUARDA, GIOVANA E LEONARDO, E A MINHA COMPANHEIRA LUCÉIA BONORA, POR SEREM A ENERGIA QUE ALIMENTA MINHA VIDA.

“NÃO PENSE QUE A CABEÇA AGUENTA SE VOCÊ PARAR”

RAUL SEIXAS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, Mariluce e Edmundo por todo Amor e Carinho derramado ao longo de toda minha vida e por terem se esforçado durante todos esses anos em me dar educação, muito obrigado AMO muito vocês;

Em especial, a minha querida e linda família, minha companheira Lucéia Bonora “Lú” por compartilhar todos os momentos felizes e tristes ao longo destes 14 anos de convivência e por ter me presenteado ao longo dessa jornada com três filhos maravilhosos, Eduarda “Duda”, Giovana “Gio” e agora com a chegada do nosso primeiro filho Leonardo “Léo”, muito obrigado, ILY, sem você nada disso seria possível;

Aos meus queridos orientadores Dra. Izeni Pires Farias e Dr. Richard C. Vogt por dividirem um pouco do vasto conhecimento sobre genética, sistemática e ecologia de quelônios e por acreditarem que eu seria capaz de chegar ao final dessa etapa tão árdua da vida que é o doutorado. Um obrigado é pouco por tudo o que vocês fizeram por mim durante todos esses anos. Ah, não poderia de deixar de agradecer ao Dr. Tomas Hrbek, considero o Sr. como meu terceiro orientador;

A UFAM/UEA, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Rede Bionorte, a Coordenação estadual e geral pelo apoio financeiro para a realização de algumas coletas de campo;

Aos coordenadores estaduais da Bionorte Profa. Dra. Antônio Queiroz Lima de Souza e Dr. Jair Max Furtunato que por várias vezes estiveram presentes quando eu mais precisei e especialmente quando necessitei de recursos pra finalizar os trabalhos de campo;

Ao coordenador geral da Bionorte Dr. Spartaco Astolfo Filho que incansavelmente luta pela qualidade da pós-graduação e por ter dividido um pouco do seu imenso conhecimento sobre Biotecnologia e sobre a vida;

A todos os professores da Bionorte/Amazonas, Dra. Antônio Queiroz, Dr. Spartaco Astolfi Filho, Dra. Izeni Pires Farias, Dr. Luiz Antônio de Oliveira, Dr. Jair Max Furtunato, Dra. Maria Fátima Bigi, Dr. Charles Roland Clement, Dr. Dimas José Lasmar, Dr. Tomas Hrbek, Dr. Edmar Pereira Marques e a todos aqueles que me capacitaram durante os anos de doutoramento;

Aos colegas do Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL/UFAM: Gabriela “Pequena mamífera”, Juliana Vieira “Tissão”, Mário Nunes, Valéria Nogueira Machado “Val”, Walescka Gravena “Wal”, Deyla Oliveira, Priscila Azarak “Pri Sex 16S”, Maria Augusta Paes Agostini “Guta”, Aline, Adriano, Fábio “Fabinho”, Roberta Canton “Beta”, Sandra Hernandez “Sandrita”, Pedro Sena, Joyce, Jéssica, Erickson “Playboy”, Israela “Sra Nunes”, Ana Paula “Bumbumzão”, Ana Paula II, Emanuel, Alexandre de Almeida, Wancley, Kelmer, Rommel Roberto Rojas “Zamora” o Peruano mais doido do sistema solar, Fabrício Bertuol “Tchê”, Euciomar Oliveira, Rodrigo, Ingrid, Roberta Cunha “Robertinha”, e a todos que fazem parte do laboratório que mais produz sequências no Amazonas;

As secretarias da secretaria estadual Vanda “Vandinha”, Joci e Tânia e a Lúcia “Lucinha” e Profa. Isabel da secretaria geral por me aturarem ao longo desses quatro anos, recebendo meus documentos atrasados e dando apoio sempre.

Aos amigos que compartilharam boas conversas pelos butecos de Manaus e nos “Churras” na minha casa, Alexandre, Zamora, KK, Gaúcho, Guta, Sandra, Davi, Túlio, Duka, Bruckshields, Rafa, Chimbinha, Rato, Tchê, Beta, Augusto, Michel, Ariane, Jone, Nanda, Alemão, Rubão, Ladislau, Barnes “Bruckshields” e todos aqueles que trocaram muitas idéias sobre ciências e coisas bizarras;

Ao grande amigo Carlão “Cabelo” e D. Nadir por todos os bons papos e por colocar na conta umas cervejinhas quanto a grana estava curta;

A banca examinadora da aula de qualificação, Dr. Carlos Schneider, Dra. Maria das Neves e Dr. Jair Max Furtunato e a banca examinadora da defesa, Dr. Paulo César Machado Andrade, Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, Dr. Cleiton Fantin, Dr. Jair Max Furtunato, muito obrigado pelas contribuições dos senhores;

Aos curadores das coleções zoológicas que permitiram acessar os espécimes, Dr. Guarino Colli - UNB, Dr. Jaime Bertoluci ESALQ/Piracicaba, Dr. Sérgio Morato MHNCI, Dr. Hussam Zaher – MZUSP, Dr. Paulo Passos - MNRJ, Robson W. Ávila - URCA, Dr. Marcos de Carvalho e Dr. Felipe Curcio – UFMT;

Ao pesquisador Dr. Diego Baldo pela doação de tecidos dos espécimes provenientes da região de Corrientes na Argentina;

A todos aqueles que me ajudaram durante essa longa caminhada e que me alojaram em seus lares e auxiliaram nas coletas de campo, Ladislau Jr, Thiago, Renildo, Fernando Ibanez, Isabela e Rafael “primos”, Jaime Bertoluci, Layse RN, Valéria Nogueira, Cíbele e Renildo “cunhados”, Sandra Hernandez, José Martinez, Priscila Azarak e família, Ana Paula “Bumbuzão”, Eliz Brito, Igor Ceará, Zamora, Ricardo Bonora, Alfredo Jr e Síría, Família Agostini (Seu Renato, Dona Goreti, Gabi e Guta), Robson Ávila e seus alunos da URCA, Alexandre Almeida, Italo Matos, Rafael “Rato” de Fraga, Elba, Mary Kay, Profa Alana, Joaquim Tadoreli “Joca”, Renildo Oliveira, Isabel Ely “Bel”, Martin Shossler, Celso Bonora meu sogro (in memoria);

Aos velhos amigos de Selva, Mário Nunes, Rafael “Rato” de Fraga, Zamora e Robson Ávila, pelo imenso auxílio com as análises, pelas sugestões, correções e por me encorajarem nos momentos mais difíceis;

Aos queridos amigos Colombianos Sandra Hernandez e José Martinez pela imensa ajuda em tornar possível a publicação dos SNP’s das populações de *Phrynops geoffroanus*.

A Vivian Uhlig (ICMbio) pela elaboração dos mapas;

Ao mestre “Dick” que me acolheu desde a minha chegada em Manaus a mais ou menos 13 anos atrás, me dando oportunidade de crescer como pesquisador. Que essa parceria possa seguir por muito tempo;

Aos pesquisadores Anders Rhodin e Russel Mittermeier por terem dado início ao sonho de resolver a problemática do “cagado de barbicha” *Phrynops geoffroanus*.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, pela licença de coleta concedida;

As instituições que financiaram este projeto, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Conservation International - CI, The Muhamed bin Zayed Species Conservation Fund pelo apoio financeiro e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa de estudo concedida.

MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO	1
Quelônios	1
Família Chelidae	3
Gênero <i>Phrynops</i>	5
Aspectos biológicos e distribuição geográfica de <i>Phrynops geoffroanus</i>	6
Estudos genéticos em <i>Phrynops geoffroanus</i>	8
Status de conservação de <i>Phrynops geoffroanus</i>	8
OBJETIVOS	9
Objetivo geral	9
Objetivos específicos	9
Escopo da Tese	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 1 – Diversidade críptica subestimada em Geoffroy’s Side-necked Turtle <i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae)	15
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos	20

Resultados.....	24
Discussão.....	30
Literatura Citada.....	36
CAPÍTULO 2 – Redescrição de Geoffroy’s Side-necked Turtle <i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigger, 1812) e revalidação taxonomica de <i>Emys viridis</i> (Spix, 1824), <i>Emys depressa</i> (Merrem, 1820) e <i>Platemys waglerii</i> (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Pleurodira: Chelidae).....	47
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	56
Resultados.....	65
Discussão.....	100
Literatura Citada.....	103
CAPÍTULO 3 - Giving Ids to turtles: SNP markers for assingment of individuals to lineages of the geographically structured <i>Phrynops geoffroanus</i> (Testudines: Chelidae).....	115
Abstract.....	117
Introdução.....	118
Material e Métodos.....	119
Resultados.....	120
Discussão.....	120
Literatura Citada.....	122

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Imagem do aspecto de como era o ancestral mais derivado das tartarugas *Eutonosaurus africanus*.....1

Figura 2. Distribuição global da família Chelidae. Circulo pontilhado em preto, destaque da ocorrência do grupo na América do Sul e Australásia. Retirado e modificado de (de la Fuente *et al.* 2014).....3

Figura 3. Distribuição geográfica das quatro espécies do gênero *Phrynops*. 1) *Phrynops williamsi*; 2) *P. hilarii*; 3) *P. tuberosus* e 4) *Phrynops geoffroanus*. Modificado de (Van Dijk *et al.*, 2014).....5

Figura 4. Espécime de *Phrynops geoffroanus*, macho adulto, coletado no rio Araguaia, município de Barra do Garças, estado do Mato Grosso.....7

CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição espacial das coletas de *Phrynops geoffroanus*. Os números representam cada uma das localidades amostradas. Sombreado em cinza, distribuição geográfica atual da espécie. Modificado de (Van Dijk *et al.* 2014).....20

Figura 2. Análise de estrutura populacional indicando a formação de quatro grupos biológicos. As cores representam os quatro grupos e suas respectivas localidades geográficas.....24

Figura 3. Topologia baseada em análise de Inferência Bayesiana utilizando haplótipos únicos dos genes 16S mtDNA , Cytb e COI concatenados, contendo 1843 pares de bases. Os valores sobre os ramos são de Probabilidade Posterior a esquerda e Bootstrap a direita. As cores das barras indicam os grupos biológicos formados pelo BAPS. Fotos da região do plastrão (ventre)

são dos indivíduos que representam cada um dos grupos. Em rosa, destaque do posicionamento de *Phrynops hilarii* na filogenia.....26

Figura 4. Rede de haplótipos gerada no programa *HaploView* (Salzburger et al. 2011) baseada nas sequências do mtDNA mostrando as relações genealógicas entre as populações de *Phrynops geoffroanus*. As cores representam as localidades de cada população analisada.....27

Figura 5. Mapa da distribuição espacial dos grupos observados na topologia Bayesiana de *Phrynops geoffroanus*. As cores representam as regiões que compõem cada um dos grupos.....28

Figura 6. Árvore datada das linhagens do mtDNA. As barras cinzas indicam os intervalos de confiança das idades e os valores das barras indicam as idades de cada um dos nós. As cores dos nomes são referentes os grupos observados na filogenia.....30

CAPÍTULO 2

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica atual de *Phrynops geoffroanus*, elaborado na última avaliação dos quelônios continentais RAN/ICMBio/IUCN/2016. Círculos preto, locais de ocorrência, círculos vermelho localidades amostradas.....56

Figura 2. Mapa do trajeto percorrido durante a “Expedição Viagem Filosófica” de Alexandre Rodrigues Ferreira. Retirado e modificado de Cunha (1991).....58

Figura 3. Mapa das linhagens observadas nas populações reconhecidas como *Phrynops geoffroanus*. Hachuras, representam os diferentes biomas brasileiro.....66

Figura 4. Árvore filogenética de inferência bayesiana e de máxima verossimilhança do complexo de espécies *Phrynops geoffroanus*.....67

Figura 5. Variação morfométrica entre linhagens definidas por caracteres moleculares de *Phrynops geoffroanus*, com base em 34 caracteres contínuos proporcionais ao comprimento da carapaça. Os eixos X e Y mostram respectivamente o primeiro e segundo eixos de fatores

discriminantes descritos por análise discriminante de componentes principais (DAPC). Cores representam diferentes linhagens, pontos representam indivíduos, e grupos são delimitados por uma elipse com 90% de inércia. A = Fêmeas, B = Machos.....69

Figura 6. Dispersão de coordenadas principais (PCA 1) representando variação morfométrica em *Phrynops geoffroanus* entre diferentes linhagens identificadas por caracteres moleculares (letras nos eixos X, A = *P. waglerii*, B = *P. geoffroanus*, C = *Phrynops* sp., D = *P. viridis* e E = *P. depressa*). Valores entre parênteses mostram porcentagem de variação capturada pelo primeiro eixo de coordenadas principais em relação às distâncias originais entre indivíduos. A = Fêmeas, B = Machos.....70

Figura 7. Distribuição espacial de coordenadas principais representando indivíduos de *Phrynops geoffroanus* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas identificadas por dados moleculares. Os eixos PCoA foram obtidos a partir de 14 variáveis morfológicas discretas e uma contínua. Cada grupo (linhagem) é representado por 11 indivíduos.....71

Figura 8. Variação morfológica entre linhagens definidas por caracteres moleculares de *Phrynops geoffroanus*, com base em 14 caracteres discretos e um contínuo. Os eixo Y mostra coordenadas principais obtidas por uma PCoA aplicada sobre uma matriz de distâncias Gower entre pares de indivíduos. (A = *P. waglerii*, B = *P. geoffroanus*, C = *Phrynops* sp., D = *P. viridis* e E = *P. depressa*).....72

Figura 9. Estado de preservação do holótipo de *Phrynops geoffroanus* MNHN 9417. A) vista lateral da cabeça; B) vista ventral da cabeça; C) vista dorsal da cabeça; D) carapaça; E) Plastrão. Fotos: Roger Bour.....77

Figura 10. Espécime de *Phrynops geoffroanus*, macho adulto, coletado no rio Araguaia, município de Barra do Garças, estado do Mato Grosso. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.....78

Figura 11. Espécime de <i>Phrynops geoffroanus</i> , macho adulto, coletado no rio Araguaia, município de Barra do Garças, estado do Mato Grosso. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.....	79
Figura 12. Espécime de <i>Phrynops hilarii</i> , fêmea adulta, coletado no rio Itajaí-Açu, município de Apiúna, estado de Santa Catarina. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente. Fotos: Tobias Saraiva Kunz, exceto detalhe da cabeça.....	80
Figura 13. Espécime de <i>Phrynops tuberosus</i> , macho adulto, coletado no rio Cauamé, município de Boa Vista, estado de Roraima. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.....	81
Figura 14. Holótipo de <i>Phrynops depressa</i> . A) vista lateral da cabeça; B) vista dorsal da cabeça; C) vista ventral da cabeça; D) carapaça; E) plastrão. Prancha: Publicada em Wied-Neuwied (1825).....	84
Figura 15. Neótipo de <i>Phrynops depressa</i> INPA-H 27809 (macho adulto).....	87
Figura 16. Habitat de <i>Phrynops depressa</i> , Rio Manhuaçu, RPPN – Miguel Feliciano Abdala, município de Caratinga, Minas Gerais.....	89
Figura 17. Estado de preservação do holótipo de <i>Phrynops viridis</i> ZSM 3008/0. A) fotografia da carapaça e do plastrão do holótipo; B) prancha publicada em (Spix, 1824).....	90
Figura 18. Espécime de <i>Phrynops viridis</i> , fêmea adulta, coletado no Rio Carinhanha, município de Carinhanha (Localidade-tipo), estado da Bahia. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.....	92

Figura 19. Habitat de <i>Phrynops viridis</i> , Rio Carinhanha (Localidade-tipo), município de Carinhanha, Bahia.....	94
Figura 20. Estado de preservação do holótipo de <i>Phrynops waglerii</i> MNHN 8758. A) vista lateral da cabeça; B) vista ventral da cabeça; C) vista dorsal da cabeça; D) carapaça; E) Plastrão. Fotos: Roger Bour.	96
Figura 21. Espécime de <i>Phrynops waglerii</i> , fêmea adulta, coletado no Rio Piracicaba, município de Piracicaba, estado de São Paulo. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.....	98
Figura 22. Habitat de <i>Phrynops waglerii</i> , Rio Piracicaba, município de Piracicaba, São Paulo.....	100

CAPÍTULO 3

Figura 1. Distribuition and localization of the lineages for the Geoffroy's Side-necked Turtle <i>Phrynops geoffroanus</i> in Brazil, for wich the forensic SNP markers were developed.....	118
Figura 2. Graph number of privative SNPs, number of fixed private SNPs (lineages 1, 2 and 3) or fixed privated SNPs with frequency > 0.91, and number of private SNP containg loci with flanking regions >80pb considered candidate targets for primer desing.....	120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valores de distância genética p entre os grupos de *Phrynops geoffroanus* utilizando o gene COI (Reid et al. 2011).....25

Tabela 2. Valores de Nm (diagonal acima) e ϕ_{ST} (diagonal abaixo) entre as populações de *Phrynops geoffroanus* ($p = 0.0001$).....29

Tabela 3. Índices de diversidade genética em *Phrynops geoffroanus*. N =número amostral; H =número de haplótipos; S =sítios polimórficos; $\hat{H}$ =diversidade gênica π =diversidade haplotípica.....29

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Sumário dos resultados do teste de Tukey aplicado para comparar a variação morfométrica por sexo entre pares de linhagens de *Phrynops geoffroanus*. Dados morfométricos são apresentados por coordenadas principais obtidas por uma análise discriminantes de componentes principais (DAPC) e as linhagens foram identificadas por caracteres moleculares. Valores em negrito mostram diferenças significativas ($P \leq 0.05$).....70

Tabela 2. Sumário de resultados do teste de Tukey aplicado para comparar a variação morfológica entre pares de linhagens de *Phrynops geoffroanus*. Dados morfológicos são representados por coordenadas principais obtidas por uma PCoA, e as linhagens foram identificadas por caracteres moleculares.....73

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Forensics SNP markers for the molecular identification, traceability and assignment of individuals to four geographical lineages of *Phrynops geoffroanus* from Brazil, which could be useful in conservation genetics analyses using traditional PCR-based genotyping.....29

Resumo

Os cágados são quelônios de água doce pertencentes a subordem Pleurodira, estão incluídos na família Chelidae que atualmente está representada por 56 espécies. O gênero *Phrynops* endêmico da América do Sul possui quatro espécies nominais: *Phrynops geoffroanus*, *P. hilarii*, *P. tuberosus* e *P. williamsi*, a primeira espécie apresenta a maior distribuição geográfica entre todos os representantes da família Chelidae. Distribuindo-se desde o sul da Venezuela ao norte da Argentina. Considerando sua ampla distribuição geográfica diversos autores tem indicado a possível existência de um complexo de espécies que será fracionado em entidades distintas. A única reavaliação do gênero *Phrynops* ocorreu no início dos anos 2000. Entre os anos de 2010 e 2015 foi coletado 223 espécimes provenientes de todas as regiões do Brasil, norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul abrangendo grande parte de sua distribuição geográfica atualmente conhecida. As coletas foram realizadas utilizando diversos métodos de coleta como armadilhas do tipo covo “*hoop traps*”, malhadeiras “*trammel nets*”, anzóis (esperas) e malhadeiras. Dados morfométricos e moleculares (genes mitocondriais, nucleares – dados genômicos) tem sido ferramentas importantes para auxiliar na delimitação de linhagens evolutivas distintas e os seus respectivos limites de distribuição geográfica. Utilizando sequenciamento do mtDNA dos genes 16S, Citocromo b e Citocromo oxidase I com o intuito de estudar e revelar os padrões de diversidade genética de *P. geoffroanus* para testar a existência de diversidade críptica. Através de análises genética utilizando dados concatenados dos genes mitocondriais foi possível observar a distinção de cinco linhagens. Dados morfológicos também auxiliaram na distinção de agrupamentos formados pelas formas morfométricas dos espécimes estudados. Sugerimos a existência de diversidade críptica em *P. geoffroanus* que possivelmente venha ser fracionado em outras entidades taxonômicas.

Palavras-chave: Chelidae, *Phrynops geoffroanus*, mtDNA, linhagens evolutivas, diversidade genética.

Abstract

Turtles are freshwater turtles belonging to the Pleurodira suborder, are included in the family Chelidae that at present is represented by 56 species. The genus *Phrynops* endemic to South America has four nominal species: *Phrynops geoffroanus*, *P. hilarii*, *P. tuberosus* and *P. williamsi*, the first species has the largest geographical distribution among all representatives of the family Chelidae. It is distributed from the south of Venezuela to the north of Argentina. Considering its wide geographical distribution, several authors have indicated the possible existence of a complex of species that will be divided into distinct entities. The only reappraisal of the genus *Phrynops* occurred in the early 2000s. Between 2010 and 2015, 223 specimens from all regions of Brazil, north, north-east, central-west, southeast and south were collected covering much of their geographic distribution currently known. The samples were collected using a variety of collecting methods such as "hoop traps" traps, trammel nets, hooks, and sanders. Morphometric and molecular data (mitochondrial genes, nuclear - genomic data) have been important tools to help delineate distinct evolutionary lineages and their respective geographical distribution boundaries. Using mtDNA sequencing of the 16S, Cytochrome b and Cytochrome oxidase I genes with the aim of studying and revealing the genetic diversity patterns of *P. geoffroanus* to test the existence of cryptic diversity. Through genetic analysis using concatenated data of the mitochondrial genes it was possible to observe the distinction of four lineages. Morphological data also helped to distinguish clusters formed by the morphometric forms of the specimens studied. We suggest the existence of cryptic diversity in *P. geoffroanus* that may possibly be fractionated in other taxonomic entities.

INTRODUÇÃO

Quelônios

Os quelônios constituem todas as tartarugas marinhas, terrestres (jabutis) e de água doce (cágados), são facilmente distinguidos das demais espécies de répteis devido à presença de uma carapaça que envolve a cintura pélvica e escapular (Zug *et al.* 2001). São animais ectotérmicos, diurnos e todas as espécies são ovíparas. São generalistas quanto à alimentação e apresentam baixa taxa de crescimento, requerendo longos períodos pra atingir a maturidade sexual (Pough *et al.* 2008).

Estima-se que os ancestrais mais antigos dos quelônios tenham surgido no Triássico superior (~260 milhões de anos), e *Eunotosaurus africanus* (Figura 1) é atualmente reconhecido como a espécie ancestral mais antiga do grupo, devido a características morfológicas exclusivamente derivada com as tartarugas (e.g Li *et al.* 2008; Lyson *et al.* 2013; 2014).



Figura 1. Imagem do aspecto de como era o ancestral mais antigo das tartarugas *Eunotosaurus africanus*. Fonte: www.wikipedia.com.br

Populações de quelônios foram estabelecidas com sucesso em diversos tipos de habitats a partir do Triássico, e desde então sofreram poucas modificações morfológicas. De modo geral, a morfologia desse grupo é única entre os vertebrados, porque combina caracteres ancestrais, como número reduzido de vértebras e a fusão das costelas (Pough *et al.* 2008; Lyson *et al.* 2013)

sendo altamente especializados, sua carapaça é recoberta por ossos, com patas dentro das costelas e com bico córneos em vez de dentes (Pough *et al.* 2008).

O surgimento da carapaça foi fundamental no sucesso evolutivo do grupo, porque reduziu significativamente a pressão de predação. Por outro lado, também limitou a diversificação de espécies, considerando que tartarugas voadoras ou planadoras nunca existiram, e mesmo o hábito arborícola não se desenvolveu (Pough *et al.* 2008).

A ordem Testudines Batsch, 1788 inclui todas as espécies de quelônios viventes, está dividida em duas subordens: Cryptodira e Pleurodira, diferenciando-se principalmente pelo mecanismo de retração do pescoço para dentro da carapaça, onde os Cryptodira (Grego, *crypto* = encondido, *dire* = pescoço) retraem o pescoço em plano vertical, enquanto que os Pleurodira (Grego, *pleuro* = lado, *dire* = pescoço) possuem retração do pescoço lateral (Pough *et al.* 2008).

Atualmente existem 335 espécies de quelônios (Van Dijk *et al.* 2014) reconhecidas pelo grupo de trabalho em taxonomia de tartarugas (TTWG – *Turtle Taxonomy Working Group*), as quais estão alocadas em 11 famílias da subordem Cryptodira (retração vertical do pescoço) e três famílias da subordem Pleurodira (retração lateral do pescoço) (Pough *et al.* 2008). A subordem Cryptodira está distribuída por todos os continentes, representada por 253 espécies, incluindo tartarugas marinhas, tartarugas de água doce e jabutis (terrestres), enquanto que a subordem Pleurodira é representada por apenas 82 espécies de tartarugas de água doce, com distribuição restrita ao hemisfério sul (Van Dijk *et al.* 2014).

Apesar de alguns grupos de quelônios serem amplamente distribuídos, a ordem como um todo é considerada como a mais ameaçada de extinção dentre os vertebrados, com mais de 60% das espécies ameaçadas por fatores como perda de habitats, comércio ilegal para *pet*, consumo de carne e utilização de várias partes do corpo na medicina tradicional (Gibbons *et al.* 2000; Moll & Moll 2004; Bour 2008; Van Dijk *et al.* 2014).

Devido as crescentes ameaças a biodiversidade global e de insuficientes políticas para reduzir a perda de biodiversidade, um grupo de especialistas analisou a riqueza e o endemismo

das tartarugas e cágados de água doce e identificou 16 hotspots nas principais áreas prioritárias de conservação da biodiversidade em países com maior riqueza de tartarugas. A identificação destas áreas prioritárias de conservação e dos países devem ajudar na conservação das tartarugas em todo o mundo (Mittermeier *et al.* 2015).

Diante deste cenário investigar a diversidade genética e realizar a revisão taxonômica de uma espécie amplamente distribuída no Brasil (*Phrynops geoffroanus*) e que ocorre em distintos biomas no Brasil se faz necessário para desvendar se este táxon abriga diversidade subestimada.

Família Chelidae

A família Chelidae Gray, 1825 é um grupo de tartarugas que reúne espécies estritamente aquáticas e semi-aquáticas, de pequeno a grande porte, distribuídas na América do Sul e Australásia (Figura 2) (Pritchard & Trebbau 1984; Iverson 1992; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Van Dijk *et al.* 2014; de la Fuente *et al.* 2014).

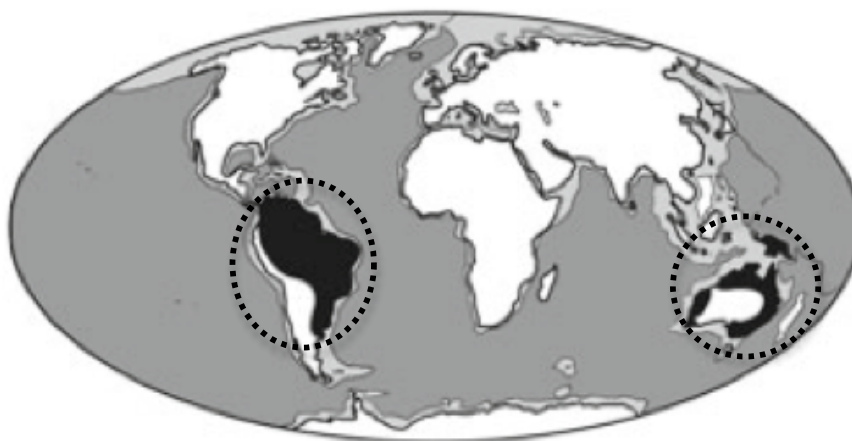


Figura 2. Distribuição global da família Chelidae. Circulo pontilhado preto, destaque da ocorrência do grupo na América do Sul e Australásia. Retirado e modificado de (de la Fuente *et al.* 2014).

Seus registros fósseis são conhecidos desde cedo no Aptian-Albian da Patagônia tendo origem na Gondwana no período do Cretáceo inferior (Lapparent de Broin & de la Fuente 2001; de la Fuente *et al.* 2011) e no Albian da Austrália (Smith 2009; 2010).

Atualmente esta família inclui 56 espécies, representando 68,2% da diversidade da subordem Pleurodira (van Dijk *et al.* 2014). É a família com maior diversidade de espécies de tartarugas continentais, e está representada na América do Sul (norte da Venezuela ao norte da Argentina e Uruguai) pelos gêneros *Acanthochelys* (duas spp.), *Chelus* (uma sp.), *Hydromedusa* (duas spp.), *Mesoclemmys* (oito spp.), *Phrynops* (quatro spp.), *Platemys* (uma sp.) e *Rhinemys* (uma sp.). Além dos gêneros sulamericanos, outros oito gêneros (*Chelodina*, *Elseya*, *Elusor*, *Emydura*, *Flaviemys*, *Myuchelys*, *Pseudemydura* e *Rheodytes*) estão distribuídos pela Australásia (Pritchard 1979; Ernest & Barbour 1989; Pritchard & Trebbau 1984; Iverson 1992; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Morales-Betancourt *et al.* 2012; Van Dijk *et al.* 2014, de la Fuente *et al.* 2014).

Esta família é caracterizada por suas cabeças largas e pescoços longos, muito útil para capturar peixes e que dobram para um dos lados da carapaça ao contrário dos Podocnemididae, membro da mesma subordem. Além disso a cabeça não é coberta por grandes escamas simétricas e sim por pele e escamas menores, a cintura pélvica é fusionada a carapaça, característica distinta dos criptodiros os quais a cintura pélvica se une por meio de ligamentos (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Morales-Betancourt *et al.* 2012). Além destas características a família apresenta duas condições autapomórficas principais: 1) inclui a fórmula da articulação das vertebra cervicais, adjacente ao atlas biconvexo, três opistocólicas, duas biconvexas, uma procoelosa, uma vertebra bicôncava e uma biconvexa e 2) desenvolvimento de uma emarginação lateral da bochecha com a perda do quadratojugal (Williams 1950; de la Fuente *et al.* 2014).

Gênero *Phrynops*

O gênero *Phrynops* Wagler, 1830 compreende quatro espécies de tartarugas endêmicas da América do Sul (Van Dijk *et al.* 2014). Duas delas possuem distribuição restrita ao sul da América do Sul, no sul do Paraguai, Argentina, Uruguai e sul do Brasil (*P. hilarii* e *P. williamsi*), ou ao norte da América do Sul, no Escudo das Guianas no Brasil, Venezuela e Colômbia (*P. tuberosus*), e a espécie (*Phrynops geoffroanus*) possui a maior distribuição geográfica de todas as espécies da família Chelidae, distribuindo-se desde o sul da Venezuela ao norte da Argentina (Pritchard & Trebbau 1984; Rhodin & Mittermeier 1983; Ernest & Barbour 1989; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Cisneros-Heredia *et al.* 2006; Baldo *et al.* 2007; Vogt 2008; Schneider *et al.* 2011; Van Dijk *et al.* 2014) (Figura 3).

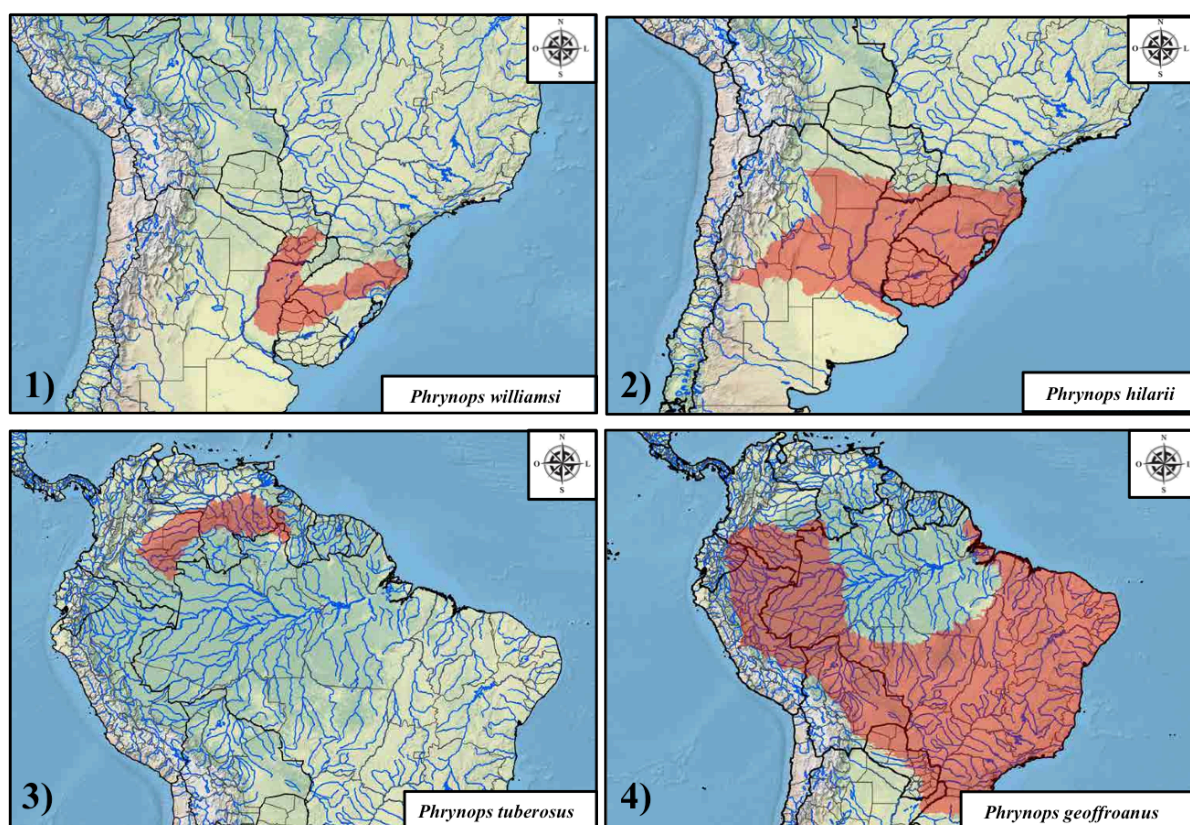


Figura 3. Distribuição geográfica das quatro espécies do gênero *Phrynops*. 1) *Phrynops williamsi*; 2) *P. hilarii*; 3) *P. tuberosus* e 4) *Phrynops geoffroanus*. Modificado de (Van Dijk *et al.* 2014).

De fato, a história taxonômica da ordem Pleurodira do Novo Mundo ainda é muito confusa, em função da escassez de estudos sobre sistemática e taxonomia (McCord *et al.* 2001),

principalmente das espécies do gênero *Phrynops*. Por exemplo, uma revisão taxonômica de *Phrynops* reduziu o número de espécies por sinonimização de 13 para apenas quatro (McCord *et al.*, 2001). Especificamente sobre *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 apesar de que autores terem sugerido um complexo de espécies ao longo de décadas, evidências sobre a identidade taxonômica de espécies adicionais nunca foram mostradas de forma robusta (Rhodin & Mittermeier 1983; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008; Schneider *et al.* 2011).

Aspectos biológicos e distribuição geográfica de *Phrynops geoffroanus*

Entre os membros da família Chelidae *Phrynops geoffroanus* é a espécie mais facilmente reconhecida, devido à presença de uma carapaça oval e aplainada, de coloração marrom-escuro a preto, com estrias radiais claras e uma quilha central pouco acentuada (Ernst & Barbour 1989). O plastrão possui coloração vermelho-alaranjada, com manchas pretas irregulares, presente nos juvenis e que eventualmente desaparecem nos adultos (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008). Possui dimorfismo sexual bastante pronunciado em relação ao tamanho e peso, os machos são menores que as fêmeas, as quais podem atingir comprimento da carapaça maior ou igual ≥ 390 mm e pesar mais de 2,5 kg (Vogt 2008).

A espécie é conhecida popularmente por diversos nomes em diferentes regiões do Brasil, “cágado-de-barbicha”, “cágado-de-barbelo”, “cangapara”, “capininga”, “tartaruga-pescoço-de-cobra”, “lalá” e “cágado” (Figura 4).

Habita uma variedade de corpos d’água, podendo ser encontrada em grandes rios, rios de correnteza, pequenos córregos, lagoas, açudes e ainda em canais poluídos nos centros urbanos (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008; Bujes 2010; Martins *et al.* 2010; Morales-Betancourt *et al.* 2012). A espécie é estritamente aquática, mas nas horas mais quentes do dia podem termorregular sobre rochas e troncos de árvores caídas nas margens de corpos d’água (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008).



Figura 4. Espécime de *Phrynops geoffroanus*, macho adulto, coletado no rio Araguaia, município de Barra do Garças, estado do Mato Grosso.

É onívora, alimenta-se de frutos, sementes, folhas, fungos, insetos, crustáceos, moluscos e peixes (Fachín-Terán *et al.* 1995; Vogt 2008). A reprodução ocorre durante a estação seca, variando nas diferentes regiões do País. A nidificação é feita em locais abertos, com solos argilosos (barrancos), onde as fêmeas cavam covas superficiais medindo entre 8 e 10 cm de profundidade. Até 28 ovos são depositados por ninho, os quais levam de 115 a 186 dias para eclodir (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008).

A espécie é apreciada para alimentação em algumas regiões no norte e nordeste do país por populações ribeirinhas, e sua banha é utilizada na medicina tradicional (comun. pessoal.). Na região norte, as comunidades ribeirinhas relataram que tanto os ovos quanto a carne causam reação alérgica (Vogt 2008).

Em território brasileiro *Phrynops geoffroanus* ocorre em biomas com características estruturais e clima bastante distintos (Iverson 1992; Fachín-Terán *et al.* 1995; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008; Van Dijk *et al.* 2014), como as florestas úmidas e densas da Amazônia e Mata Atlântica, e ambientes mais secos e abertos como a Caatinga e Cerrado.

Estudos genéticos em *Phrynops geoffroanus*

Diversos autores têm usado diferentes abordagens moleculares para testar o monofiletismo da família Chelidae (e.g Seddon *et al.* 1997; Shaffer *et al.* 1997; Georges *et al.* 1998; Guillon *et al.* 2012) e do gênero *Phrynops* (e.g., Shaffer *et al.* 1997; Fujita *et al.* 2004; Krenz *et al.* 2005; Shaffer & Thomson 2007; Friol 2014). No entanto, as relações filogenéticas entre as populações que ocorrem ao longo de toda a distribuição geográfica do gênero ainda são pouco conhecidas.

Recentemente Friol (2014) realizou um estudo sobre filogenia do gênero *Phrynops* utilizando dados morfométricos, osteológicos e moleculares (genes mitocondriais e nucleares) abrangendo populações da espécie provenientes de todas as bacias hidrográficas brasileiras. Neste estudo a autora concluiu que: 1) *Phrynops* (*sensu stricto*) representa um grupo monofilético; 2) a partir dos dados moleculares concatenados *Phrynops hylarii* ficou posicionado dentro do clado formado pelas populações de; 3) a população de *P. geoffroanus* do Rio Doce demonstrou ser claramente distinta das demais populações estudadas; 4) espécimes de *Phrynops williamsi* proveniente do rio Iguaçu separa-se do clado formado pela população do rio dos Peixe.

Status de conservação

O status de conservação de *P. geoffroanus* ainda é deficiente devido a falta de informações sobre as principais ameaças e declínio das populações que ocorrem ao longo de sua distribuição geográfica no Brasil.

Atualmente qualquer tomada de decisão para conservação envolvendo *P. geoffroanus* considera a espécie como uma única entidade biológica, ficando evidente a necessidade de avaliar a diversidade neste táxon para reavaliação de seu status de conservação. A espécie não está classificada em nenhuma das categorias da IUCN nem nos Apêndices da CITES.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar uma revisão taxonômica e filogenética de populações reconhecidas como *Phrynops Geoffroyi*.

Objetivos específicos

- Testar e descrever padrões morfológicos e filogenéticos em diferentes linhagens de *P. Geoffroyi*;
- Produzir uma hipótese filogenética para *P. Geoffroyi*;
- Redefinir os limites de distribuição geográfica para diferentes linhagens de *P. Geoffroyi*.

Escopo da Tese

Esta tese está dividida em três capítulos, descritos a seguir. Todos eles estão formatados de acordo com as normas estabelecidas por cada periódico.

Capítulo 1: investigamos a diversidade genética em *Phrynops Geoffroyi* ao longo de sua distribuição geográfica. Foram utilizados marcadores mitocondriais para detectar estruturação genética em linhagens independentes. Este capítulo será submetido à revista *Chelonian Conservation and Biology*.

Capítulo 2: apresentamos um estudo sistemático de *Phrynops Geoffroyi* baseado em dados morfométricos, morfológicos e moleculares, com objetivo principal de elaborar uma diagnose atualizada de populações que representam linhagens independentes e possíveis espécies que compõem este complexo de espécies. São discutidas as relações entre as entidades taxonômicas observadas e suas respectivas distribuições geográficas. Esse capítulo será submetido à revista *Zootaxa*.

Capítulo 3: desenvolvemos SNP's nucleares para *Phrynops Geoffroyi*, objetivando identificar estruturação genética, utilizando sequenciamento de nova geração com base em

genotipagem pela plataforma Ion Torrent PGM. Esse capítulo está publicado na *Conservation Genetic Resources*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDO, D., MARTINEZ, P., BOERIS, J.M., AND GIRAUDO, A.R. 2007. Notes on Geographic Distribution. Reptilia, Chelonii, Chelidae, *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 and *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973): Distribution extension, new country record, and new province records in Argentina. Check List 4:348–352.

BATSCH, A.J.G.C. 1788. Versuch einer Anleitung zur Kenntniss und Geschichte der Thiere und Mineralien. Erster Theil. Allgemeine Geschichte der Natur; besondere der Säugthiere. Vögel. Amphibien und Fische. Jena: Akademische Buchhandlung, 258 pp.

BOUR, R. 2008. Global diversity of turtles (Chelonii; Reptilia) in freshwater. 2008. Hydrobiologia 595:593–598.

BUJES, C.S. 2010. Os Testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural conservação. Iheringia Série Zoológica 4:413–424.

CISNEROS-HEREDIA, D.F. 2007. Turtles of the Tiputini Biodiversity Station with remarks on the diversity and distribution of the Testudines from Ecuador. Biota Neotropica v6 (n1) – <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/abstract?inventory+bn00906012006>.

DE LA FUENTE, M.S., STERLI, J. AND MANIEL, I. 2014. Origin, Evolution and Biogeographic History of South American Turtles. Springer Earth System Sciences, 168 pp.

DE LA FUENTE, M.S., UMAZANO, A.M., STERLI, J. AND CABALLIDO, J.I. 2011. New Chelid of the lower section of the Cerro Barcino formation (Aptian-Albian?), Patagonia. Cretaceous Res 32:527–537.

ERNEST, C.H. AND BARBOUR, R.W. 1989. Turtles of the World. Washington Smithsonian Institution Press, 313 pp.

FACHÍN-TERÁN, A., VOGT, R.C., AND GÓMEZ, M.F.S. 1995. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guapore, Rondonia, Brazil. *Journal of Herpetology* 29 4:536–547.

FRIOL, N.R. 2014. Filogenia e Evolução das espécies do gênero *Phrynops* (Testudines: Chelidae). Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia, 70 pp.

FUJITA, M.K., ENGSTROM, TAG N., STARKEY, D.E., AND SHAFFER, B. 2004. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intro. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:1031–1040.

GEORGES, A., BIRREL, J., SAINT, K.M., MCCORD, W. AND DONNELLAN, S.C. 1998. A phylogeny for side-necked turtles (Chelonia:Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. *Biological Journal of Linnean Society* 67:213–246.

GIBBONS, J.W., SCOTT, D.E., RYAN, T.J., BUHLMANN, K.A., TUBERVILLE, T.D., METTS, B.S., GREENE, J.L., MILLS, T., LEIDEN, Y., POPPY, S., AND WINNE, C.T. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *Bioscience* 50:653–666.

GRAY, J.E. 1825. Catalogue of Shield Reptiles in the Collection of the British Museum. Part 1. Testudinata (Tortoises). Taylor and Francis, London., 79 pp.

GUILLON, J.M., GUÉRY, L., HULIN, V., GIRONDOT, M. 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology* 81:147–158.

IVERSON, J.B. 1992. A Revised Checklist with distribution Maps of the Turtle of the World. Earlham College. Privately Printed Richmond, Indiana, 1–359 pp.

KRENZ, J.G., NAYLOR, G.J.P., SHAFFER, H.B., AND JANZEN, F.J. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:178–191.

- LAPPARENT DE BROIN, F. AND DE LA FUENTE, M.S. 2001. Oldest world Chelidae (Chelonii, Pleurodira) from Cretaceous of Patagonia. C. R. Acad. Sci. Paris 333:463–470.
- LI, C., WU, XIAO-CHUN., RIEPPEL, O., WANG, LI-TING., AND ZHAO, LI-JUN. 2008. An ancestral turtle from the Late Triassic of south. Nature 456:497–501.
- LYSON, T.R., BEVER, G.S., SHEYER, T.M., HSIANG, A.Y., AND GAUTHIER, J.A. 2013. Evolutionary Origin of the Turtle Shell. Current Biology 23:1113–1119.
- LYSON, T.R., BEVER, G.S., BHULLAR, B.A.S., JOYCE, W.G., AND GAUTHIER, J.A. 2014. Transitional fossils and the origin of turtles. Biology Letters 6:830–833.
- MARTINS, F.I., SOUZA, F.L., AND COSTA, H.T.M. 2010. Feeding Habits of *Phrynops geoffroanus* (Chelidae) in an Urban River in Central Brazil. Chelonian Conservation and Biology 9:294–297.
- MITTERMEIR, R.A., VAN DIJK, P.P., RHODIN, A.G.J AND NASH, S.A. 2015. Turtle Hotspots: An Analysis of the Occurrence of Tortoises and Freshwater Turtles in Biodiversity Hotspots, High-Biodiversity Wilderness Areas, and Turtle Priority Areas. Chelonian Conservation and Biology 1:2–10.
- MCCORD, W.P., JOSEPH-OUNI, M., AND LAMAR, W.W. 2001. A Taxonomic Reevaluation of *Phrynops* (Testudines: Chelidae) with the description of two new genera and new species of *Batrachemys*. Revista de Biología Tropical 49:715–764.
- MOLL, D. AND MOLL, E.O. 2004. The Ecology, Exploitation and Conservation of River Turtles. Oxford University Press, Oxford.
- MORALES-BETANCOURT, M.A., LASSO, C.A., AND PÁEZ, V.P. 2012. V. Biología y. Conservación de las tortugas continentales de Colombia. (eds) Páez, V. P.; Morales-Betancourt, M. A.; Lasso, C. A.; Castaño-Mora. O.; Bock, B. C. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia, 266–268 pp.

POUGH, F.H., HEISER, J.B., AND JANIS, C.M. 2008. A vida dos vertebrados. Atheneu Editora São Paulo, 4ª Edição., 695 pp.

PRITCHARD, P.C.H. 1979. Encyclopedia of Turtles. New Jersey: T. F. H Publications. 883 pp.

PRITCHARD, P.C.H. AND TREBBAU, P. 1984. The Turtles of Venezuela. SSAR Contributions to Herpetology, 2. Ithaca, New York 403 pp.

RHODIN, A.G.J. AND MITTERMEIER, R.A. 1983. Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P. geoffroanus* complex. In: Rhodin, A.G.J. and Miyata, Kenneth. (Editors). Advances in Herpetology and Evolutionary Biology. Essays in Honor of Ernest E. Williams. Cambridge, Massachusetts: Museum of Comparative Zoology 58–73 pp.

RUEDA–ALMONACID, J.V., CARR, J.L., MITTERMEIER, R.A., RODRÍGUEZ–MACHECHA, J.V., MAST, R.B., VOGT, R.C., RHODIN, A.G.J., OSSA–VELÁSQUEZ, J., RUEDA, J.N AND MITTERMEIER, C. G. 2007. Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del 16 Trópico. Serie de Guías Tropicales de Campo N 6. Conservation International. Editorial Panamericana, Formas e Impressos. Bogotá, Colômbia, 538 pp.

SEDDON, J.M., GEORGES, A., BAVERTOCK, P.R., AND MCCORD, W. 1997. Phylogenetic Relationships of Chelid Turtles (Pleurodira: Chelidae) Based on Mitochondrial 12S rRNA Gene Sequence Variation. Molecular Phylogenetics and Evolution 7:55–61.

SCHNEIDER, L., FERRARA, C., AND VOGT, R.C., 2011. Nesting Ecology and Nest Predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in the Guapore River of the Brazilian and Bolivian Amazon. Chelonian Conservation and Biology 10:206–212.

SCHWEIGGER, A.F. 1812. Prodromus monographiae Cheloniorum. Koenigsberg. Arch. Naturw. Math. 1:271–368, 406–458.

SHAFFER, H.B., MEYLAN, P., AND MCKNIGHT, M.L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular,

morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology* 46:235–268.

SHAFFER, H.B., THOMSON, R.C. 2007. Delimiting Species in Recent Radiations. *Syst. Biol.* 6:896–906.

SMITH, E.T. 2009. Turtle treasures from Opal fields of Lightning ridge, New South Wales. Turtle Symposium. In: Braman, D; Brikman, D; Marion, C (eds) Abstracts and program, vol 1, Special publication of the Royal Tyrell Museum. Royal Tyrell Museum of Paleontology, Drumheller, pp. 167–168.

SMITH, E.T. 2010. Early Cretaceous chelids from Lightning Ridge. New South Wales Alcheringa 34:375–384.

VAN DIJK, P.P., IVERSON, J.B., RHODIN, A.G.J., SHAFFER, H.B., AND BOUR, R. 2014. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution, with Maps and Conservation Status. In: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Bulhmann, K.A., Iverson, J.B., and Mittermeier, R.A. (Eds). *Conservation Biology of Freshwater Turtle and Tortoise: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. Chelonian Research Monographs 5:329–479.

VOGT, R.C. 2008. Amazon Turtles. Ed. Lima. Vol 1, pp. 66–69.

WAGLER, J. 1830. *Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugthiere und Vögel*. Stuttgart und Tübingen, München: J. G. Cotta. vi + 354 pp., 9 pls.

WILLIAMS, E.E. 1950. Variation and Selection in the Cervical Central Articulations of Living Turtles. 94:505-562.

ZUG, G.R., VITT, L.J., CALDWELL, J.P. 2001. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California, USA, 630 pp.

CAPÍTULO 1

CARVALHO, V. T., RHODIN, A. G. J., MITERMEIER, R. A., NUNES, M. S., HRBEK, T., VOGT, R. C., FARIAS, I. P. Underestimated cryptic diversity in Geoffroy's Side-necked Turtle *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae). Manuscrito formatado segundo as normas do periódico *Chelonian Conservation and Biology*.

Underestimated cryptic diversity in Geoffroy's Side-necked Turtle *Phrynops*
geoffroanus (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae)

Vinicius Tadeu de Carvalho^{1,2*}, Richard C. Vogt³ Anders G. J. Rhodin⁴, Russel A. Mittermeier⁵,
Mário da Silva Nunes², Tomas Hrbek², Izeni Pires Farias²

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, PPG-Bionorte, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Mini-Campus, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil [anfibios.repteis@gmail.com];

²Laboratório de Evolução e Genética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Mini-Campus, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil [marionunesufam@gmail.com; izeni@evoamazon.net; tomas@evoamazon.net]

³Chelonian Research Foundation, 168 Goodrich Street, Lunenburg, Massachusetts 01462 USA [rhodinCRF@aol.com];

⁴Conservation International, 2011 Crystal Drive, Suite 500, Arlington, Virginia 22202 USA [r.mittermeier@conservation.org];

⁵Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Campus II, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil [vogt@inpa.gov.br]

**Corresponding author*

ABSTRACT. – Turtles are among the most endangered of the major groups of vertebrates surpassing birds, mammals, fishes and amphibians. The genus *Phrynops* (Chelidae) currently comprises four species distributed in South America *Phrynops geoffroanus* occurs from southern Venezuela to northern Argentina, and it has been found in different biomes in Brazil. The taxonomic status of this species has been questioned by several authors in relation to their taxonomic identity, due to the vagueness in the definition of the type locality and morphological variation along its wide geographical distribution. In this study, we analyzed an extensive set of molecular data of *P. geoffroanus* collected throughout the geographic distribution of the species in Brazil with the goal to access the phylogenetic status. We used mitochondrial markers 16S mtDNA, cytochrome b (Cytb) and Cytochrome oxidase I (COI) to access the genetic diversity within *P. geoffroanus*. We used Bayesian inference for phylogenetic reconstruction and population structure analysis - BAPS, molecular analysis of variance – AMOVA, haplotype network and genetic distance between groups and individuals to identify different biological groups. We identified four distinct groups of *P. geoffroanus*, which are currently recognized as a unique biological entity. Additionally, we show that environmental differences play an important role in genetic differentiation between lineages. Based on the largest data set available for *P. geoffroanus*, we identified that this taxon presents cryptic diversity, which reinforces the idea that the biological diversity of fresh water turtles is often underestimated.

KEY WORDS: Mitochondrial markers, molecular analysis, Bayesian inference, cryptic diversity, geographic distribution.

INTRODUÇÃO

Os quelônios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados do planeta com aproximadamente 60% das espécies listadas atualmente como ameaçadas de extinção, superando aves, mamíferos, peixes e anfíbios (van Dijk et al. 2014). Assim existe um esforço no sentido de se conhecer mais sobre os diversos aspectos da biologia e ecologia das espécies deste grupo, os quais somente recentemente incluem aspectos dos padrões filogeográficos e de genética de populações (Alacs et al. 2007) que são de fundamental importância para o conhecimento da diversidade do grupo.

Estudos filogenéticos utilizando marcadores moleculares tem mostrado que a diversidade biológica pode ser subestimada pela inclusão de populações geneticamente distintas em um único epíteto específico (e.g. Guicking et al. 2009; Fouquet et al. 2014; Gehara et al. 2014; Shamblin et al. 2015; Guarnizo et al. 2016). Assim o conhecimento dessa diversidade críptica é prioritária para a conservação, uma vez que espécies crípticas são unidades importantes da diversidade e podem representar taxa ameaçados, anteriormente desconhecidos (Georges e Adams 1996; Georges et al. 1998; Walker et al. 1998; Fritz et al. 2005).

Neste contexto, utilizou-se o DNA mitocondrial para investigar padrões da divergências genéticas entre populações de uma tartaruga de água doce, a qual é amplamente distribuída pela América do Sul e que possui variação morfológica regional evidente. A ampla distribuição geográfica da espécie associada a alta tolerância ecológica, faz desse grupo de organismos de vida longa um excelente modelo para estudar genética da conservação.

A espécie foco deste estudo pertence ao gênero *Phrynops* Wagler, 1830 que inclui atualmente quatro espécies endêmicas da América do Sul (McCord et al. 2001), com distribuição restrita ao sul do continente (*Phrynops hilarii* e *Phrynops williamsi*) ou ao Escudo das Guianas (*Phrynops tuberosus*), ou distribuição ampla ao longo de diferentes biomas, desde o sul da Venezuela ao norte da Argentina (*Phrynops geoffroanus*) (McCord et al. 2001; Van Dijk et al. 2014).

Apesar de alguns autores considerarem *P. geoffroanus* um complexo de espécies que compreende *P. hilarii*, *P. williamsi* e *P. tuberosus* (Rhodin e Mittermeier 1983), esse arranjo taxonômico é questionável (Rueda-Almonacid et al. 2007). Particularmente para *P. geoffroanus*, a extensa distribuição geográfica, associada à variação morfológica regional, gera dúvidas sobre a possível existência de diversidade não reconhecida, evidenciadas por linhagens geneticamente distintas e geograficamente estruturadas (Friol 2014).

Estudos sobre relações filogenéticas entre populações de *P. geoffroanus* ainda são escassos (e.g. Shaffer et al. 1997; Fujita et al. 2004; Krenz et al. 2005; Friol 2014). Além de problemas taxonômicos, a falta de dados genéticos ao longo da distribuição da espécie (Rueda-almonacid et al. 2007; Vogt 2008) associada à dificuldade em delimitar linhagens evolutivas independentes, gera um problema para a implementação de programas de conservação. Atualmente qualquer tomada de decisão para conservação envolvendo *P. geoffroanus* considera o táxon como uma única entidade biológica, ficando evidente a necessidade de avaliar a diversidade genética de distintas populações para reavaliar seu status de conservação.

No presente estudo nós amostramos *P. geoffroanus* em grande parte da área de sua distribuição geográfica no território brasileiro, com intuito de obtermos dados da estrutura populacional intraespecífica e identificar possíveis linhagens evolutivas independentes. Devido ao hábito aquático, nós esperavamos que diferentes linhagens evolutivas de *P. geoffroanus* estivessem isoladas pelas bacias hidrográficas da América do Sul. Adicionalmente, porque a espécie ocupa ambientes estruturalmente muito diferentes, nós esperamos que linhagens provenientes de ambientes abertos (e.g. Cerrado e Caatinga) sejam filogeneticamente mais próximas entre si do que em comparação a linhagens provenientes de florestas, e desta forma, acreditávamos que qualquer estruturação observada poderia estar também relacionada a diferentes biomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *Phrynops geoffroanus* foram coletados em 24 localidades ao longo da distribuição geográfica do táxon no Brasil (Figura 1). As coletas foram realizadas entre 2010 e 2015 em diferentes bacias hidrográficas e biomas brasileiros. Foram sequenciados três indivíduos adicionais, provenientes de Corrientes, Argentina. Também amostramos *P. tuberosus*, *P. williamsi* and *P. hylarii*. Adicionalmente, obtivemos uma sequência de *P. hylarii* (Genbank: JN999705.2) para compor o banco de dados.

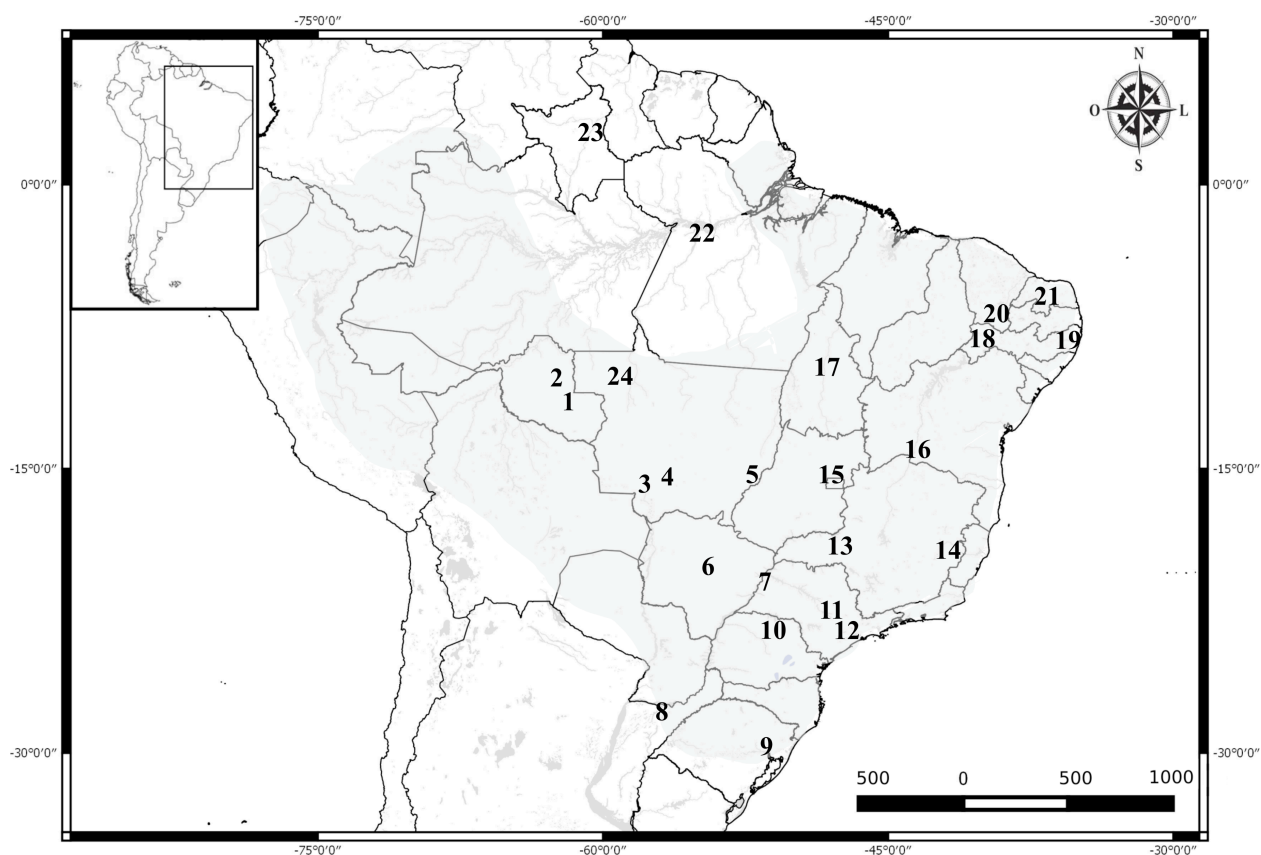


Figura 1. Distribuição espacial das coletas de *Phrynops geoffroanus*. Os números representam cada uma das localidades amostradas. Sombreado em cinza, distribuição geográfica atual da espécie. Modificado de (Van Dijk et al. 2014).

Nós capturamos indivíduos utilizando seis métodos complementares: busca ativa e captura com puçá (1,5 m de diâmetro); armadilhas de anzol nº 6 sem ferrão (linha de 0,50 mm), contendo carne bovina como isca; malhadeiras *Trammel net* (Vogt 1980), com duas malhas

externas e uma interna, 100 m de comprimento por 2 m de largura; rede de espera, com malhadeira de 70 mm entre nós opostos; armadilhas *Hoop traps* (Legler 1960), com uma ou duas entradas e iscas de carne bovina.

O DNA genômico foi extraído de tecido muscular conforme o protocolo de fenol / clorofórmio (Sambrook et al. 1989). A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 %. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotômetro NanoDrop 2000, para verificar a concentração e qualidade do DNA.

Os fragmentos parciais dos genes 16S mtDNA, Citocromo b (Cytb) e Citocromo oxidase I (COI) foram amplificados por PCR, utilizando a combinação dos seguintes *primes*, respectivamente: 16Sar(L) e 16Sbr(H) (Palumbi 1996), L14725 (Pääbo 1990), H 15573 (Taberlet et al. 1992) e LturtCOIa, HturtCOIa (Reid et al. 2011). As condições de amplificação da PCR para cada *primer* foram as seguintes: Para 16S — 92°C (1 min), 35 ciclos de 92°C (1 min), 50°C (40 s), 72°C (90 s), 72°C (5 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 12 µL que continha, 4.8 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de dNTPs (10 mM), 1.25 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM KCl₂), 1 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL); Para Citocromo b — 95°C (1 min), 35 ciclos de 95°C (10 s), 48°C (30 s), 72° C (40 s), 72°C (7 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 15 µL que continha, 6.2 µL ddH₂O, 1.8 µL de 25 mM MgCl₂, 1.5 µL de dNTPs (10 mM), 1.2 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM KCl₂), 1.5 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL); Para COI — 95°C (5 min), 35 ciclos de 95°C (45 s), 54°C (45 s), 72°C (45 s), 72°C (6 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 12 µL que continha, 4.8 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de dNTPs (10 mM), 1.25 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM KCl₂), 1 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL).

Os produtos da PCR foram purificados com ExoSap seguindo instruções do fabricante (ThermoFisher. com). As reações de sequenciamento dos produtos de PCR para os três genes foram realizados utilizando o kit Big Dye Terminator conforme as especificações do fabricante (Life Technologies). Os *primers* da amplificação foram utilizados para sequenciamento bidirecional. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado em etanol e EDTA e ressuspendido em 10 µL de formamida para ser sequenciado automaticamente usando ABI 3500 (Life Technologies).

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa *Geneious* 8.1.8 (Kearse et al. 2012), usando o algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994). As sequências finais foram concatenadas e incorporadas em uma matriz geral no formato CodonCode Aligner v.3.5.2 (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>). Nós selecionamos os melhores modelos de evolução molecular usando jModeltest (Guidon e Gascuel 2003; Posada 2008).

Para determinar as unidades evolutivas independentes usamos os seguintes argumentos: agrupamento biológico por isolamento reprodutivo e divergência alélica, alta estrutura populacional intra-grupos, monofilia nos genes mitocondriais “barcode”, divergência molecular maior ou igual $\geq 1.3\%$ e tempo de coalescência inter-grupos.

Para inferir a estrutura genética das populações de *P. geoffroanus* a partir das sequências de DNA mitocondrial de genes concatenados, foi realizada uma análise de estrutura populacional utilizando um método que visa formar grupos biológicos no programa BAPS – *Bayesian Analysis of Population Structure* v.6.0 (Corander et al. 2003; Corander et al. 2008). Essa abordagem objetiva identificar número de grupos biológicos (*K*) com probabilidades posteriores mais altas. Para tanto nos testamos de 1-20 *K*-grupos.

A análise filogenética de Inferência Bayesiana foi produzida pelo programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) e consistiu de quatro cadeias de MCMC – Markov Chain Monte Carlo de 10×10^7 gerações com frequência de amostragem a cada 10.000 gerações. A convergência das cadeias independentes foram verificados usando o programa Tracer v1.4 (Rambaut et al. 2007),

sendo que 10% das árvores obtidas antes do estado estacionário foram descartadas como *burn-in*. Também foram executadas análises filogenéticas utilizando os algoritmos de Máxima Verossimilhança que foram inferidas utilizando o programa PhyML 3.0 (Guidon et al. 2010). O suporte filogenético foi avaliado através de 1.000 replicações não paramétrica de bootstrap (Felsenstein 1985). Adicionalmente, calculamos as distâncias não corrigidas (p-distâncias) intra e interespecíficas no programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011) entre os grupos identificados pelo programa BAPS.

Foi gerada uma rede de haplótipos no programa *HaploViewer* (Salzburger et al. 2011) objetivando visualizar as relações genealógicas entre os indivíduos, por meio de uma árvore não enraizada. Este programa realiza a conversão das árvores geradas a partir de métodos de reconstrução filogenética em genealogias de haplótipos. A árvore utilizada nessa análise foi gerada utilizando o algoritmo de Máxima Verossimilhança no programa *TreeFinder* v.2011 (Jobb et al. 2004), utilizando um modelo evolutivo (TN+G4) previamente obtido no jModeltest (Guidon e Gascuel 2003; Posada 2008).

Nós usamos Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizada através do programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier e Lischer 2010), para testar a estrutura populacional entre e dentro das localidades amostradas. Esta análise é baseada na variância das frequências gênicas em uma análise hierárquica dos componentes da variância com ênfase nas diferenças entre indivíduos, e entre ou dentro das populações, por meio do índice Φ_{ST} , que é análogo ao índice de fixação (F_{ST}) (Excoffier et al. 1992).

Para estimar os tempos de divergências entre as linhagens evolutivas identificadas na árvore filogenética de inferência Bayesiana, utilizamos o programa BEAST v1.8.2 (Drummond e Rambaut 2007). Para calibrar a árvore utilizamos datação secundária proposta por Near et al. (2005). As análises foram feitas utilizando o modelo log-normal não correlacionado, assumindo um relógio molecular relaxado, que atribui taxas de evolução independentes sobre diferentes ramos. Para esta análise, realizamos duas corridas independentes de 50×10^7 de gerações, que

posteriormente foram combinadas utilizando o programa Logcombiner no BEAST v1.8.2 (Drummond e Rambaut 2007), considerando um *burn-in* de 10 %.

RESULTADOS

Foram analisadas 101 amostras de *Phrynops geoffroanus* para cada gene um dos genes mtDNA: 16S rRNA (511 pb), Cytb (562 pb) e COI (770 pb), totalizando 1843 pares de bases concatenados para compor o banco de dados para a análise filogeográfica. Também foram sequenciadas amostras das espécies *Phrynops tuberosus* e *Phrynops williamsi* para os mesmos genes. Para a espécie *Phrynops hilarii* as sequências foram obtidas no GenBank.

As análises de estrutura genética baseada nos genes mitocondriais concatenados para a determinação dos grupos biológicos no programa BAPS, inferiram a presença de quatro grupos ($K = 4$) dentro do grupo *Phrynops geoffroanus* (Figura 2).

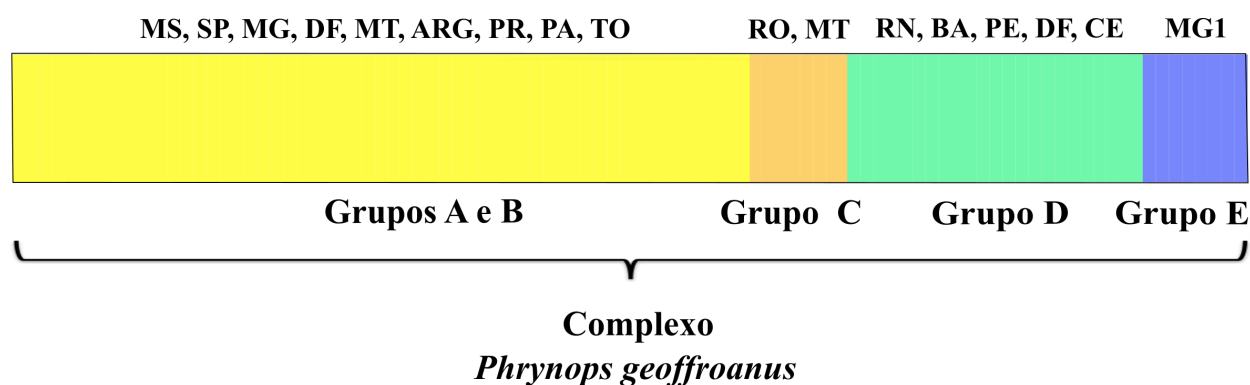


Figura 2. Análise de Estrutura Populacional indicando a formação de quatro grupos biológicos. As cores representam os quatro grupos e suas respectivas localidades geográficas.

Nas análises filogenéticas de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança foi observado a existência de cinco clados dentro de *P. geoffroanus*, resultado discordante da análise de estrutura genética inferida através do BAPS que identificou a presença de quatro grupos biológicos.

Os clados que compõem o complexo *P. geoffroanus* formados pelos Grupos A, B, C, D e E formam um grupo monofilético (Figura 3). Interessantemente, *P. hilarii* está incluída dentro do complexo *P. geoffroanus* e está mais relacionado a linhagem do Grupo A. Observamos também que os clados compostos pelos Grupos C, D e E apresentam altos valores de probabilidade posterior e bootstrap (1/100), enquanto que o clado composto pelos Grupos A e B apresentaram valores inferiores. Os valores de *p-distance* não corrigidos do gene COI entre os grupos indicados pela análise filogenética são mostrados na (Tabela 1). Nas relações genealógicas, a rede de haplótipos revelou alto grau de estruturação genética, e não compartilhamento de haplótipos entre os grupos observados (Figura 4).

Tabela 1. Valores de distância genética *p* entre os grupos de *Phrynops geoffroanus* utilizando o gene COI (Reid et al. 2011).

GRUPOS	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1. Grupo A	—							
2. Grupo B	0.012	—						
3. Grupo C	0.022	0.018	—					
4. Grupo D	0.024	0.020	0.025	—				
5. Grupo E	0.022	0.017	0.023	0.015	—			
6. <i>Phrynops hilarii</i>	0.010	0.010	0.019	0.022	0.019	—		
7. <i>Phrynops tuberosus</i>	0.027	0.022	0.031	0.026	0.024	0.024	—	
8. <i>Phrynops williamsi</i>	0.072	0.071	0.076	0.073	0.072	0.072	0.075	—

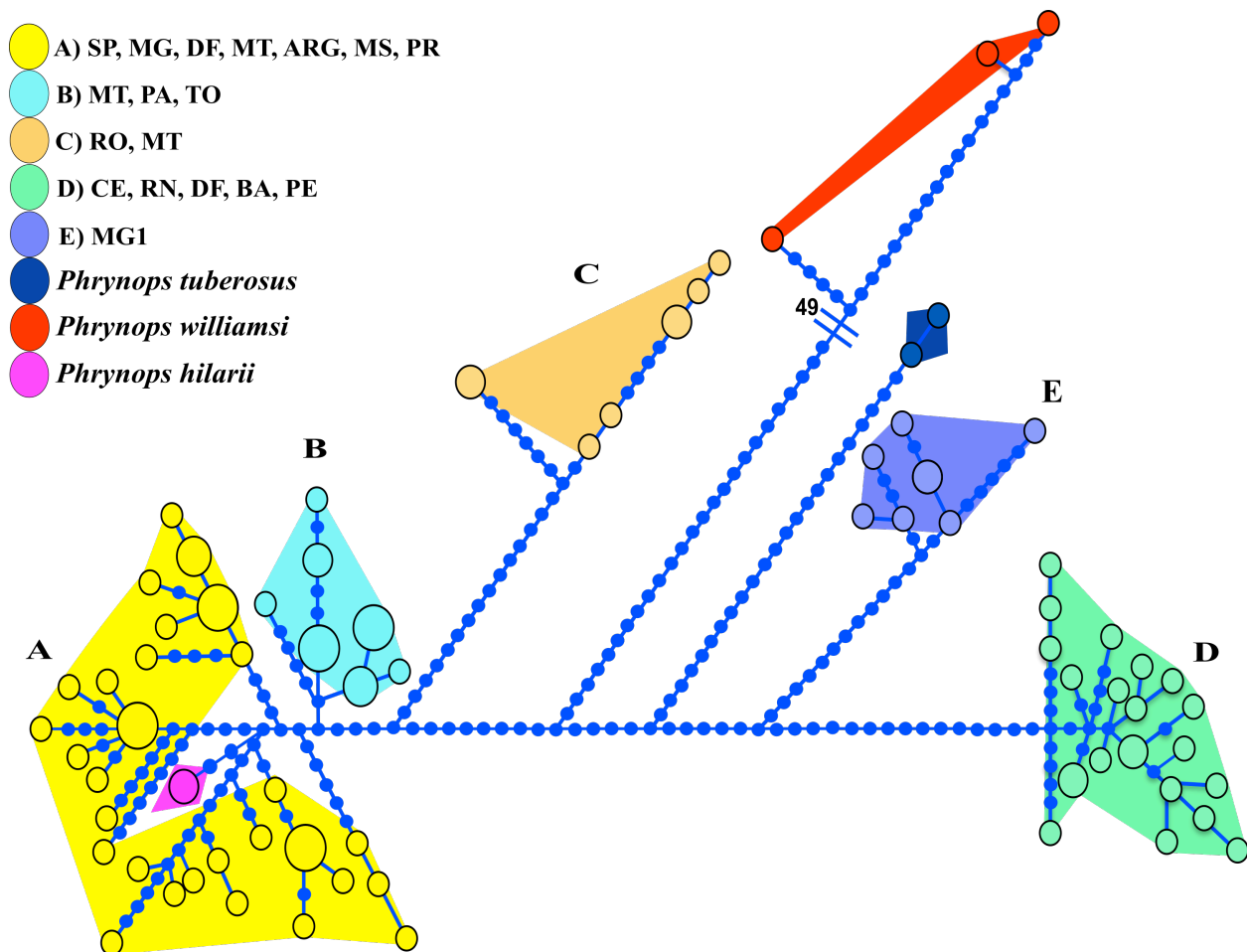


Figure 4. Rede de haplótipos gerada no programa *HaploView* (Salzburger et al. 2011) baseada nas sequências do mtDNA mostrando as relações genealógicas entre populações de *Phrynops geoffroanus*. As cores representam as localidades de cada população analisada.

Associando os grupos observados na filogenia à distribuição espacial dos seus espécimes, eles foram classificados em: Grupo A (Amarelo), populações de *Phrynops geoffroanus* dos estados de MS, SP, MG, DF, MT, PR e ARG, presentes nas bacias hidrográficas dos rios Paraguai, Paraná e nos biomas (Cerrado, Mata Atlântica); Grupo B (Azul claro), populações de *P. geoffroanus* dos estados do MT, TO e PA, presentes nas bacias hidrográficas dos rios Paraguai, Tocantins-Araguaia, Tapajós, e nos biomas (Cerrado, Amazônia); **Grupo C** (Laranja) populações de *P. geoffroanus* dos estados de RO e MT, presentes nas bacias hidrográficas dos Rios Machado e Aripuanã, afluentes do Rio Madeira, bioma (Amazônia); Grupo D (Verde) populações de *P. geoffroanus* dos estados de CE, RN, PE, BA e DF presentes

nas bacias hidrográficas do rio São Francisco e Atlântico Nordeste Oriental, e nos biomas (Caatinga e Mata Atlântica); Grupo E (Lilás) população de *P. geoffroanus* do estado de MG presente na bacia hidrográfica do rio Doce e no bioma (Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica) (Figura 5).

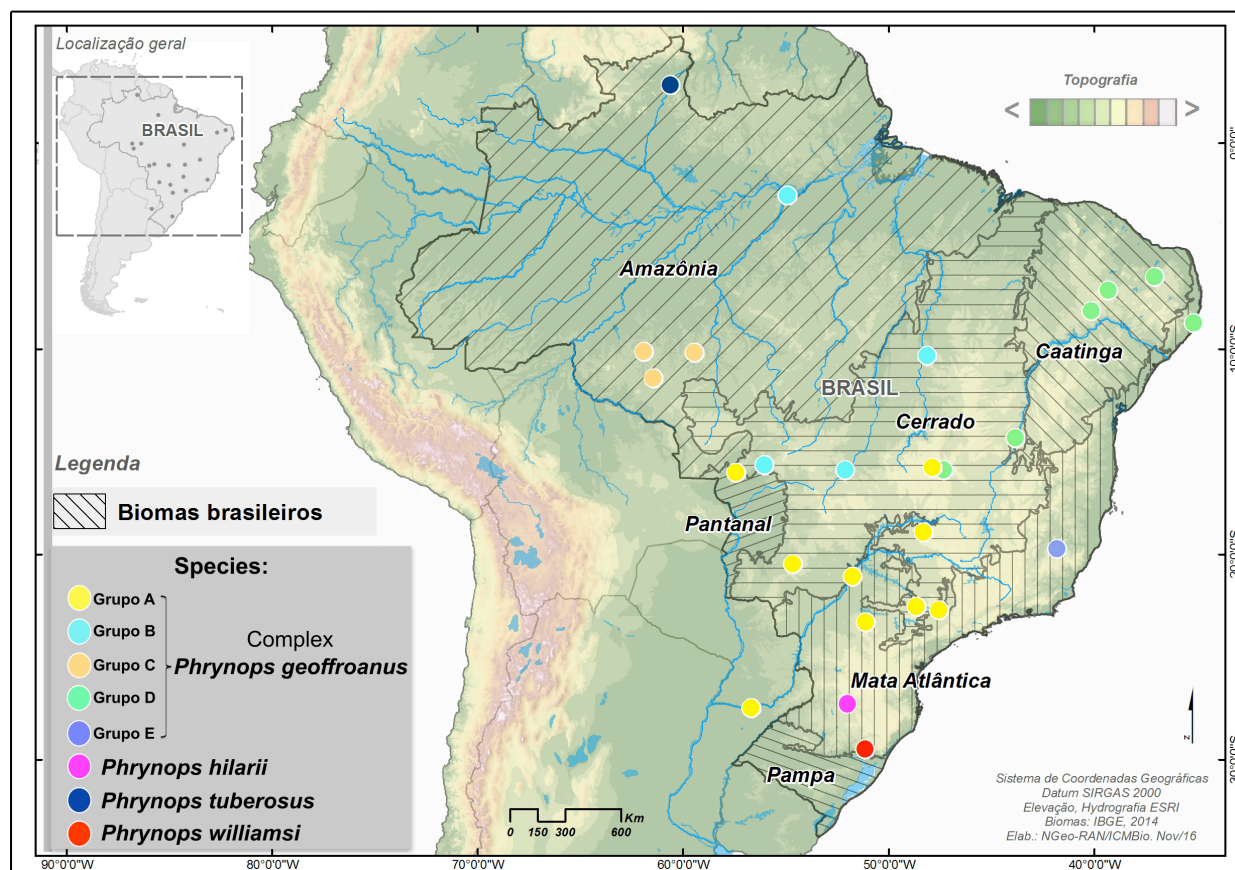


Figura 5. Mapa da distribuição espacial das linhagens observadas na topologia Bayesiana de *Phrynops geoffroanus*.

Na análise de variância molecular (AMOVA) observamos a existência de alto nível de diferenciação genética entre os grupos ($F_{st} = 0.75312$, $p < 0.0001$). A variação entre os grupos biológicos pré-definidos na análise filogenética foi de 75,31 %, da variação contida entre os grupos. Estes resultados foram confirmados pelas comparações par a par do F_{st} que apresentaram valores significativos de P para todas as comparações (Tabela 2) e os índices de diversidade estão mostrados na (Tabela 3).

Tabela 2. Valores de Nm (diagonal acima) e ϕ_{ST} (diagonal abaixo) entre as populações de *Phrynops geoffroanus* ($p = 0.0001$).

Grupos	A	B	C	D	E
A	–	0.09826	0.08932	0.10843	1.21976
B	0.29074	–	0.07575	0.09526	0.26123
C	0.65684	0.82179	–	0.06308	0.17851
D	0.73691	0.83996	0.84844	–	0.17295
E	0.74300	0.88797	0.86843	0.83576	–

Tabela 3. Índices de diversidade genética em *Phrynops geoffroanus*. N=número amostral; H=número de haplótipos; S=sítios polimórficos; $\hat{H}$ =diversidade gênica π =diversidade haplotípica.

Grupos	N	H	S	$\hat{H}$	π	D de Tajima	F_s de FU
A	39	30	87	0.9784 ± 0.0127	0.006618 ± 0.003395	– 1.49008	– 10.69862
B	18	8	17	0.8693 ± 0.0493	0.001943 ± 0.001157	– 1.05764	– 0.58762
C	8	6	16	0.9286 ± 0.0844	0.004147 ± 0.002466	– 1.22582	– 0.38179
D	23	21	43	0.9921 ± 0.0154	0.003850 ± 0.002091	– 1.51883	– 13.30185
E	8	7	17	1.0000 ± 0.0625	0.003081 ± 0.001882	– 0.69068	– 1.61567

A datação das linhagens do mtDNA utilizando análise Bayesiana indicou que o ancestral do complexo *Phrynops geoffroanus* surgiu no Mioceno há aproximadamente 23,72 Ma (HPD 95%: ~5.4–39.3 Ma) (Figura 6). O início da sua diversificação dos diferentes grupos e do grupo B ocorreu há aproximadamente 13.5 Ma (HPD 95%: ~2.4–24.7 Ma). Os grupos D e E divergiram há aproximadamente 5.3 Ma (HPD 95%: ~0.3–13.4 Ma), enquanto que *Phrynops tuberosus* diversificou destes grupos há aproximadamente 10,48 Ma (HPD 95%: ~1.6–21.1 Ma). O grupo C divergiu há aproximadamente 5,1 Ma (HPD 95%: ~0.5–15.8 Ma) seguida da diversificação do grupo A com a inclusão de *P. hylarii* há aproximadamente 1,86 Ma (HPD 95%:

~0.06–4.8 Ma). A análise também indicou que *P. williamsi* separou do complexo *P. geoffroanus* a ~23,72 Ma.

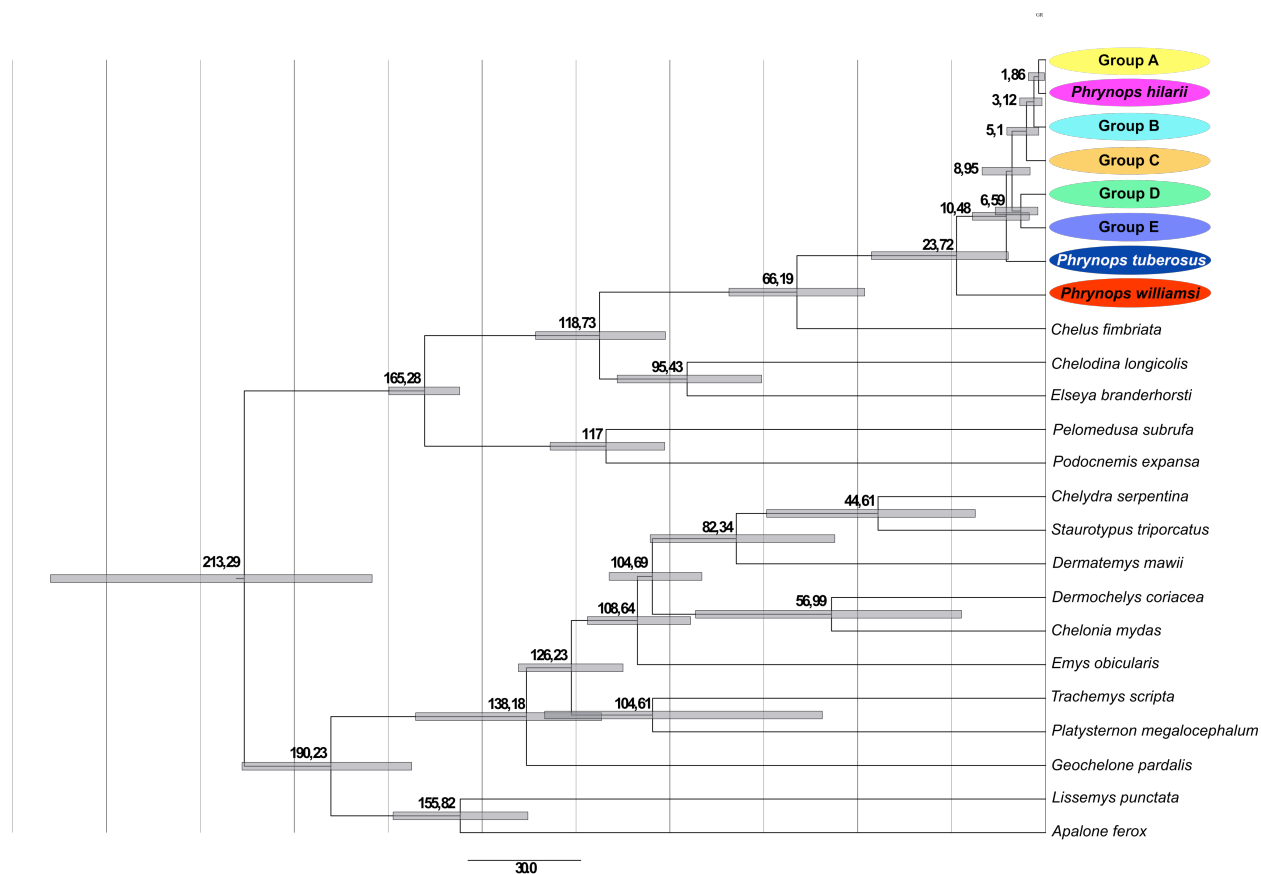


Figura 6. Árvore datada das linhagens do mtDNA. As barras cinzas indicam os intervalos de confiança das idades e os valores das barras indicam as idades de cada um dos nós. As cores dos nomes são referentes os grupos observados na filogenia.

DISCUSSÃO

Levando em consideração os resultados da análise filogenética, distância p, alto grau de estrutura genética inespecífica, tempo de divergência e padrões de diversificação, sugerimos a existência de cinco linhagens evolutivas distintas no complexo de *P. geoffroanus*, que são geograficamente estruturado. As divergências moleculares entre estas linhagens são relativamente altas, maiores ou igual a ($\geq 2\%$) e indicam uma espécie com alto grau de estruturação genética ou um complexo de espécies enigmáticas. Padrão semelhante de

estruturação foi observado por Reid et al. (2011) para vários grupos de quelantes. Portanto, nossos resultados confirmaram previsões anteriores (Rhodin e Mittermeier 1983, Rueda-Almonacid et al., 2007, Vogt 2008) que *P. geoffroanus* é um complexo de espécies diferentes e que essa diversidade de linhagens dentro desse complexo foi historicamente subestimada.

Nossa hipótese filogenética sugere que *Phrynops tuberosus* é o taxon da irmã para o complexo de *P. geoffroanus*, e *P. williamsi* é a primeira espécie divergente do gênero. É interessante notar que *Phrynops hilaarii* está incluído no complexo de *P. geoffroanus*, sendo filogeneticamente aninhado dentro da linhagem A (amarelo). Este resultado sugere que o status taxonômico desta espécie precisa ser reavaliado.

A análise filogenética revelou dois grupos principais do complexo de *P. geoffroanus*, um grupo com linhagens A, B e C e outro grupo composto pelas linhagens D e E. A linhagem A, com ampla distribuição, ocorre principalmente centro-oeste, sul e sudeste do Brasil dentro da drenagem das bacias hidrográficas do Paraná-Paraguai, ocorrendo predominantemente no bioma Cerrado. A linhagem B ocorre nas drenagens Tocantins-Araguaia e Paraná-Paraguai, com alguns espécimes provenientes da região do Cerrado na floresta amazônica, em Santarém. A linhagem C é o grupo irmão de A e B, e tem sua distribuição nos Rios Aripuanã e Tapajós, também na região do Cerrado na bacia amazônica. O outro grande grupo é composto pelas linhagens D e E, sendo a linhagem D predominante na drenagem do São Francisco e litoral do nordeste e a linhagem E nas drenagens do Atlântico leste. Essas bacias de drenagem ocorrem predominantemente nos biomas da Caatinga e da Mata Atlântica, respectivamente.

Ao contrário do que esperávamos, a diferenciação genética entre as linhagens de *P. geoffroanus* parece não ter sido totalmente conduzida pelas bacias hidrográficas. As bacias hidrográficas por si só não explicam o padrão de distribuição dos grupos / linhagens. Há também uma estreita associação de linhagens e biomas ou tipos de vegetação (Figura 5). Considerando que esses animais são aquáticos e vivem em rios, riachos e lagos, e que o processo de diversificação sugerido foi principalmente através da dispersão (resultados S-Diva), as variações

nos ecossistemas e topografia presentes no Brasil em combinação com os padrões regionais, que conduziram essas bacias hidrográficas, se refletem na distribuição de linhagens de *P. geoffroanus* e, em última instância, podem ser o reflexo dos processos que influenciaram a história evolutiva, incluindo barreiras naturais, colonização e extinção local. Por exemplo, a linhagem A está associada a drenagens das bacias do rio Paraguai-Paraná drenando o ecossistema arbustivo e gramado - o Cerrado do Brasil central e a Mata Atlântica e os Pampas da Argentina. A linhagem B, que é irmã da linhagem A, também é encontrada em drenagens do cerrado do oeste do Brasil e savanas amazônicas, ecossistemas semelhantes ao cerrado. A linhagem C, irmã dos grupos A e B, só é encontrada nas drenagens da bacia amazônica no Brasil em florestas abertas de cerrado de transição. A linhagem D é predominante da bacia do Rio São Francisco e nas drenagens do Atlântico nordeste dos biomas da Caatinga e da Mata Atlântica e é filogeneticamente mais próxima da linhagem E que ocorre na bacia do rio Doce, uma drenagem do Atlântico leste, no bioma da Mata Atlântica.

Poucos estudos investigaram o endemismo e padrões biogeográficos de quelídeos sul-americanos, especialmente no Brasil (e.g. Ippi e Flores 2001, McCord et al., 2001); apenas Souza (2005), em um estudo preliminar, analisou a associação da distribuição de quelídeos brasileiros e clima, e características do habitat para determinar se os aspectos ambientais ou físicos podem ser relevantes na modelagem dos padrões biogeográficos do grupo. Ele usou análises de parcimônia de endemidade (PAE) (Morrone, 1994) e sugeriu que as semelhanças de áreas de espécies entre os quelídeos refletem padrões diferentes para bacias de drenagem e biomas na América do Sul e, mais especificamente, no Brasil. Em relação aos padrões da bacia de drenagem, ao contrário do obtido por Souza (2005), nossos resultados mostraram uma estreita relação entre a bacia amazônica e a drenagem Paraná-Paraguai e entre a bacia do São Francisco e as drenagens da costa do Atlântico nordeste. Dentro da linhagem A, a linhagem C, presente na drenagem da Amazônica, apresentava um padrão mais divergente. Nossos resultados em relação aos biomas sugerem uma relação direta entre as linhagens da Amazônia e do Cerrado, e entre a

Mata Atlântica e Caatinga. Uma relação biogeográfica direta entre as linhagens do cerrado e o bioma da Amazônia foi mencionada para outros grupos de organismos, onde a colonização da Amazônia para o Cerrado foi seguida de diversificação (Rodrigues 2005; Werneck 2011). A falta de congruência observada da relação de drenagem e bioma pode estar relacionada à capacidade dessas espécies de se adaptarem a diferentes condições do habitat que podem ter parte do sinal evolutivo para a diversificação das linhagens do complexo de *P. geoffroanus* em toda a sua área de distribuição. Essas espécies são generalistas e capazes de habitar ecossistemas altamente alterados (Souza e Abe, 2000, 2001; Ferronato et al., 2009). Eles são resilientes e capazes de suportar altos níveis de toxinas em seus tecidos e vivem por longos períodos, mesmo em regiões poluídas (Brites e Rantim, 2004).

Nossas análises de datação indicam que o ancestral de *Phrynops* estava presente no médio Mioceno (~ 23,7 Ma). A linhagem ancestral de *Phrynops* divergiu em dois grandes grupos, no Cerrado e Amazônia, respectivamente, representados pelas linhagens A e C, cerca de 5,1 Ma (Figura). As linhagens da Caatinga e da Mata Atlântica, que representam as linhagens D e E divergiram cerca de 6.5 Ma, enquanto a linhagem B e A + C divergiram cerca de 19,2 Ma.

O meio-Mioceno caracterizou-se por uma grande onda de extinções terrestres e aquáticas que seguiram o Clima Ótimo do Mioceno (18-16 Ma) cerca de 14,8-14,5 Ma anos depois, durante a fase de Langham no meio do Mioceno. Entre 14,8 e 14,1 Ma, houve um feitiço de frio importante e permanente que ocorreu e foi associado a um aumento na produção de água fria e profunda da Antártida e ao aumento da cobertura de gelo da Antártida Oriental. A linhagem ancestral de *Phrynops* originou-se neste período (Figura), e começou a diversificar cerca de 9,8 Ma. O evento principal neste período foi a finalização do aumento da altitude do platô central brasileiro, cerca de 7-5 Ma, este evento foi importante para a diversificação de muitos grupos de herpetofauna dentro dos biomas abertos do Brasil, e foi visto como o principal fator que determina as diferenças na biota do Cerrado em relação aos biomas adjacentes (Werneck et al., 2012). Nossos resultados reforçam a importância desses eventos do Mioceno na diversificação

da fauna do Brasil, como observado em outros estudos (por exemplo, Delsuc et al., 2004; Steiner et al., 2005; Wesselingh e Salo 2006; Gamble et al., 2008; Werneck et al. . 2012).

Implicações para conservação

As tartarugas e tortugas de água doce estão entre os grupos de animais mais ameaçados no planeta hoje, com quase metade dos taxa ameaçados de extinção; esta porcentagem é maior do que para todos os outros grupos de vertebrados (Alacs et al., 2007; Buhlmann et al., 2009; Van Dijk et al., 2014; Mittermeier et al., 2015). Os principais fatores de ameaça são os principais impactos da perda e destruição do habitat, a exploração comercial de alimentos, animais de estimação e medicina popular (Gibbons et al., 2000; Moll e Moll 2004; Bour 2008). Os principais fatores são a pura ganância desenfreada para o ganho comercial de indivíduos em uma sociedade capitalista que não tem escrúpulos em destruir a natureza para ganhos pessoais. Até que os interesses comerciais e o ganho pessoal sejam consciência limitada, as tartarugas estarão em perigo neste planeta.

A conservação pode ser aumentada quando a compreensão dos padrões filogenéticos e da estrutura genética das populações são usadas para separar linhagens nas descrições de novas espécies. Estudos como o nosso são importantes e úteis para descobrir a diversidade genética das tartarugas e são fundamentais para tomar decisões envolvidas na gestão e conservação de espécies (Alacs et al., 2007, Spinks et al., 2014, Shamblin et al., 2015), é impossível conservar o que não é conhecido.

Nossos resultados baseados em genes mitocondriais sugerem cinco linhagens de *P. geoffroanus*. Além disso, os SNPs recentemente identificados são exclusivos para cada uma dessas linhagens (Carvalho et al., 2016). Seguindo os critérios de Moritz (1994), essas linhagens corresponderam a cinco Unidades Evolutivas Significativas e merecem conservação.

Somente os biomas do Amazonas e da Mata Atlântica foram considerados nos pontos críticos da biodiversidade de tartarugas de água doce e terrestre no Brasil (Mittermeier et al.,

20015). Aqui demonstramos que a variação ambiental entre os habitats do dossel aberto e fechado tem um papel importante na diversidade genética de *P. geoffroanus*. As ações de conservação devem ser aplicadas em escalas mais refinadas para categorizar habitats dentro dos biomas que estão sendo preservados.

São urgentes medidas diferentes para a conservação de populações de *P. geoffroanus*: controle da mortalidade rodoviária de fêmeas e crias que se deslocam para e de locais de nidificação, programas educacionais para indígenas e moradores de rios que utilizam adultos e ovos para alimentação e conservação de áreas de nidificação. É importante realizar estudos ecológicos em cada uma das linhagens descritas para obter os dados necessários para manter essas trajetórias evolutivas em um estado de reprodução preservado. Se não sabemos o suficiente sobre a história natural dessas linhagens, elas podem se perder ao longo do tempo por negligência.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todas as pessoas que auxiliaram nas coletas de campo. Aos pesquisadores Rommel R. R. Zamora, Rafael de Fraga, Robson W. Ávila pela sugestões e correções do manuscrito. Ao Dr. Diego Baldo pela doação das amostras da Argentina. Os trabalhos de campo foram apoiados pela Conservation International – CI, The Mohamed bin Zaeyd Species Conservation Fund, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico – CNPq (SISBIOTA 563348/2010-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, SISBIOTA/FAPEAM, Projeto Quelônios da Amazônia – Petrobrás Ambiental. Ao apoio da bolsa de VTC concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade pela concessão da licença de coleta (MMA/ICMBio/SISBIO 43175–2).

LITERATURA CITADA

- AGUIAR, A.J.C. AND MELO, G.A.R. 2007. Taxonomic revision, phylogenetic analysis, and biogeography of the bee genus *Tropidopedia* (Hymenoptera, Apidae, Tapino taspidini). Zoological Journal of the Linnean Society 151:511–554.
- ALACS, E.A., JANZEN, F.J., AND SCRIBNER, K.T. 2007. Genetic issues in freshwater turtle and tortoise conservation. Turtle Conservation Genetics Working Group. Defining turtle diversity: Proceedings of a workshop on Genetics, Ethics, and Taxonomy of Freshwater Turtles and Tortoises. In: Shaffer, H.B., FitzSimmons, N.N., Georges, A., Rhodin, A.G.J. (Eds). Chelonian Research Monographs 4:107–123.
- BAUM, D.A. AND DONOGHUE, M.J. 1995. Choosing among alternative “Phylogenetics” species concepts. Systematic Botany 4:560–573.
- BOUR, R. 2008. Global diversity of turtles (Chelonii; Reptilia) in freshwater. 2008. Hydrobiologia 595:593–598.
- BRITES, V.L.C AND RANTIM, F.T. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtle, *Phrynops Geoffroyanus* taken from two areas of the Uberabinha River. Environmental Monitoring and Assessment 96:273–281.
- BROWN, K.S. AND GIFFORD, D.R. 2002. Lepidoptera in the Cerrado landscape and the conservation of vegetation, soil, and topographical mosaics. In: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna. Columbia University Press, New York, pp. 201–222.
- BUHLMANN, K.A., AKRE, T.S.B., IVERSON, J.B., KARAPATAKIS, D., MITTERMEIER, R., GEORGES, A., RHODIN, A.G.J., VAN DIJK AND GIBBONS, J.W. 2009. A global analysis of tortoise and freshwater turtle distributions with identification of priority conservation areas. Chelonian Conservation and Biology 8:116–149.

- CRACRAFT, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1:159–187.
- CRACRAFT, J. 1989. Speciation and its ornithology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns of processes of differentiation. In: D. Otte and J.A. Endler (Eds). *Speciation and its Consequences*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc, pp. 28–59.
- DE QUEIROZ, K. 2005. A Unified Concept of Species and Its Consequences for the Future of Taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 18:196–215.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56:879–886.
- DELSUC, F., VIZCAÍNO, S.F., AND DOUZERY, E.J.P. 2004. Influence of Tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. *BMC Evolutionary Biology* 4:1–13.
- DRUMMOND, A.J. AND RAMBAUT, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:1–8.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., AND QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 2:479–491.
- EXCOFFIER, L. AND LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* 10:564–567.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 4:783–791.

- FERRONATO, B.O., GENOY-PUERTO, A., PIÑA, C.I., SOUZA, F.L., VERDADE, L.M., AND MATUSHIMA, E.R. 2009. Notes of the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers Southeastern Brazil. *Zoologia* 4:795–798.
- FOUQUET, A., CASSINI, C.S., HADDAD, C.F.B., PECH, N., AND RODRIGUES, M.T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41:855–870.
- FRIOL, N.R. 2014. Filogenia e evolução das espécies do gênero *Phrynops* (Testudines: Chelidae). Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia, 70 pp.
- FRITZ, U., FATTIZZO, T., GUICKING, D., TRIPRPI, S., PENNISI, M.G., LENK, P., JOGER, U. AND WINK, M. 2005. A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zoologica Scripta* 34:351–371.
- FUJITA, M.K., ENGSTROM, TAG N., STARKEY, D.E., AND SHAFFER, B. 2004. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intro. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:1031–1040.
- GAMBLE, T., SIMONS, A.M., COLLI, G.R., AND VITT, L.J. 2008. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46:269–277.
- GEHARA, M., CRAWFORD, A.J., ORRICO, V.G.D., RODRIGUEZ, R., LÖTETERS, S., FOUQUET, A., BARRIENTOS, L.S., BRUSQUETTI, F., DE LA RIVA, I., ERNST, R., URRUTIA, G.G., GLAW, F., GUAYASAMIN, J.M., HÖLTING, M., JANSEN, M., KOK, P.J.R., KWET, A., LINGNAU, R., LYRA, M., MORAVEC, J., POMBAL JR, J.P ROJAS–RUNJAC, F.J.M., SCHULZE, A., SEÑARIS, J.C., SOLÉ, M., RODRIGUES, M.T., TWOMEY, E., HADDAD, C.F.B., VENCES, M., AND KÖHLER, J. 2014. High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *Plos One* 9:1–12.

- GEORGES, A. AND ADAMS, M. 1996. Electrophoretic delineation of species boundaries within the short-necked freshwater turtles of Australia (Testudines: Chelidae). *Zoological Journal of Linnean Society* 118:241–260.
- GEORGES, A., BIRREL, J., SAINT, K.M., MCCORD, W., AND DONNELLAN, S. C. 1998. A phylogeny for side-necked turtles (Chelonia: Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. *Biological Journal of Linnean Society* 67:213–246.
- GEORGES, A., AND THOMSON, S. 2010. Diversity of Australasian freshwater turtles, with an annotated synonym and keys to species. *Zootaxa* 2496:1–37.
- GIBBONS, J.W., SCOTT, D.E., RYAN, T.J., BUHLMANN, K.A., TUBERVILLE, T.D., METTS, B.S., GREENE, J.L., MILLS, T., LEIDEN, Y., POPPY, S., AND WINNE, C.T. 2000. The global decline of reptiles, deja vu amphibians. *Bioscience* 50:653–666.
- GUARNIZO, C.E., WERNECK, F.P., GIUGLIANO, L.G., SANTOS, M.G., FENKER, J., SOUSA, L., D'ANGIOLLELA, SANTOS, A.R., STRÜSSMANN, C., RODRIGUES, M.T., GAMBLE, T., AND COLLI, G.R. 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidea) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94:279–289.
- GUICKING, D., JORGE, U., AND WINK, M. 2009. Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR–PCR fingerprinting. *Organism Diversity and Evolution* 9:201–214.
- GUIDON, S. AND GASCUEL, O. 2003. A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704.
- GUIDON, S., DUFAYARD, J.F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., AND GASCUEL, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59:307–321.

- GUILLON, J.M., GUÉRY, L., HULIN, V., AND GIRONDOT, M. 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology* 81:147–158.
- HUEBINGER, R.M., BICKHAM, J.W., RHODIN, A.G.J., AND MITTERMEIER, R.A. 2013. Mitochondrial DNA corroborates taxonomy of the South American chelid turtles of the genera *Platemys* and *Acanthochelys*. *Chelonian Conservation and Biology* 12:168–171.
- IPPI, S., AND FLORES-VILLELA, O. 2001. Las tortugas neotropicales y sus áreas de endemismo. *Acta Zoológica Mexicana* 84:49–63.
- JADIN, R.C., TOWNSEND, J.H., CASTOE, T.A., AND CAMPBELL, J.A. 2012. Cryptic diversity in disjunct populations of Middle American montane pitvipers: a systematic reassessment of *Cerrophidion godmanii*. *Zoologica Scripta* 41:455–470.
- JOB, G., VON HAESLER, A. AND STRIMMER, K. 2004. TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4:1–18.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MENTJES, P., AND DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.
- KRENZ, J.G., NAYLOR, G.J.P., SHAFFER, H.B., AND JANZEN, F.J. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:178–191.
- LE, M., REID, B.N., MCCORD, W.P., NARO-MACIEL, E., RAXWORTHY, C.J., AMATO, G., AND GEORGES, A. 2013. Resolving the phylogenetic history of the short-necked turtles, genera *Elseya* and *Myuchelys* (Testudines: Chelidae) from Australia and New Guinea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68:251–258.
- LEGLER, J.M. 1960. A simple and inexpensive device for trapping aquatic turtles. *Proceedings of*

the Utah Academy of Science 37:257–312.

MITTERMEIER, R.A., VAN DIJK, P.P., RHODIN, A.G.J., AND NASH, S.D. 2015. Turtles hotspots: An analysis of the occurrence of tortoises and freshwater turtles in biodiversity hotspots, high biodiversity wilderness areas, and turtle priority areas. *Chelonian Conservation and Biology* 1:2–10.

MCCORD, W.P., JOSEPH–OUNI, M. AND LAMAR, W.W. 2001. A Taxonomic Reevaluation of *Phrynops* (Testudines: Chelidae) with the description of two new genera and new species of *Batrachemys*. *Revista de Biología Tropical* 49:715–764.

MOLL, D. AND MOLL, E.O. 2004. *The Ecology, Exploitation and Conservation of River Turtles*. Oxford University Press, Oxford.

MORALES–BETANCOURT, M.A., LASSO, C.A., AND PÁEZ, V.P. 2012. V. Biología y. Conservación de las tortugas continentales de Colombia. Páez, V. P., Morales–Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Castaño–Mora. O., and Bock, B. C. (Eds) *Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*, Bogota, pp. 266–268.

MORITZ, C. 1994. Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373–375.

NEAR, T.J., MEYLAN, P.A., AND SHAFFER, B.A. 2005. Assessing Concordance of Fossil Calibration Points in Molecular Clock Studies: An Example Using Turtles. *The American Naturalist* 165:137–146.

OLIVEIRA, D.P., CARVALHO, V.T., AND HERBEK, T. 2016. Cryptic diversity in lizard genus *Plica* (Squamata): phylogenetic diversity and Amazonian biogeography. *Zoologica Scripta*.

PÄÄBO, S. 1990. Amplifying ancient DNA. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego pp.

159–166.

- PALUMBI, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. e Mable, B.K. (Eds) Molecular Systematics. Sinauer e Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 205–247.
- POSADA D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biological and Evolution 25:1253–1256
- RAMBAUT, A. AND DRUMMOND, A.J. 2007. Tracer Version 1.5. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- REID, B.N., LE, M., MCCORD, W.P., IVERSON, J.B., GEORGES, A., BERGMANN, T., AMATO, G., DESALLE, R., AND NARO-MACIEL, E. 2011. Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. Molecular Ecology Resources 11:956–967.
- RHODIN, A.G.J. AND MITTERMEIER, R.A. 1983. Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P. geoffroanus* complex. In: Rhodin, A. G.J. and Miyata, K.. (Eds.). Advances in Herpetology and Evolutionary Biology. Essays in Honor of Ernest E. Williams. Cambridge, Massachusetts: Museum of Comparative Zoology 58–73.
- RODRIGUES, M.T. 2005. The conservation of brazilian reptiles: Challenges for a megadiversity country. Conservation Biology 3:659–664.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D.L., DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, MA., AND HUELSENBECK, J. P. 2012. MrBayes 3.2: bayesian phylogentic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61:539–542.
- RUEDA-ALMONACID, J.V., CARR, J.L., MITTERMEIER, R.A., RODRÍGUEZ-MACHECHA, J.V., MAST, R.B., VOGT, R.C., RHODIN, A.G.J., OSSA-VELÁSQUEZ, J., RUEDA, J.N AND

- MITTERMEIER, C. G. 2007. Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del 16 Trópico. Serie de Guías Tropicales de Campo N 6. Conservation International. Editorial Panamericana, Formas e Impressos. Bogotá, Colômbia, 538 pp.
- SALZBURGER, W., EWING, G.B., AND VON HAESELER, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20:1952–1963.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY, 1626 pp.
- SCHNEIDER, L., FERRARA, C., AND VOGT, R.C. 2011. Nesting ecology and nest predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in the Guapore River of the Brazilian and Bolivian Amazon. *Chelonian Conservation and Biology* 10:206–212.
- SCHWEIGGER, A.F. 1812. *Prodromus monographiae Cheloniorum*. Koenigsberg. *Arch. Naturw. Math* 1:271–368, pp. 406–458.
- SHAFFER, H.B., MEYLAN, P., AND MCKNIGHT, M.L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology* 46:235–268.
- SHAMBLIN, B.M., DUTTON, P.H., BJORNDAL, K.A., BOLTEN, A.B., NARO-MACIEL, E., SANTOS, A.J.B., BELLINI, C.B., MARCOVALDI, M.A., AND NAIRN, C.J. 2015. Deeper mitochondrial sequencing reveals cryptic diversity and structure in Brazilian Green Turtle rookeries. *Chelonian Conservation and Biology* 14:167–172.
- SOUZA, F.L. 2005. Geographical distribution patterns of South American side-necked turtles (Chelidae), with emphasis on Brazilian species. *Revista Española de Herpetología* 19:33–46.
- SOUZA, F.L., AND ABE, A.S. 2000. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle,

- Phrynops geoffroanus* inhabiting an urban river in southeastern Brazil. *Journal of Zoology* 252:437–446.
- SOUZA, F.L., AND ABE, A.S. 2001. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus* inhabiting an urban river in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 36:57–62.
- SPINKS, P.Q., THOMSON, R.C., MÜGE, G., AND SHAFFER, H. B. 2014. Multilocus phylogeny of the New–World mud turtles (Kinosternidae) supports the traditional classification of the group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76:254–260.
- STEINER, C., TILAK, M., DOUZERY, E.J.P., AND CATZEFLIS, F.M. 2005. New DNA data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene diversification of living South America opossums (Marsupialia, Didelphidae). *Molecular Phylogenetics Evolution* 35:363–379.
- TABERLET, P., MEYER, A., AND BOUVET, J. 1992. Unusual mitochondrial DNA polymorphism in two local populations of blue tit (*Parus caeruleus*). *Molecular Ecology* 1:27–36.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., AND KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., AND GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position–specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11:4673–4680.
- THOMSON, S. AND GEORGES, A. 2009. *Myuchelys* gen. nov. – a new genus for *Elseya latisternum* and related forms of Australian freshwater turtle (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *Zootaxa* 2053:32–42.

- THOMSON, S., AMEPOU, Y., ANAMIATO, J., AND GEORGES, A. 2015. A new species and subgenus of *Elseya* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from New Guinea. *Zootaxa* 4006:59–82.
- THOMSON, S. AND GEORGES, A. 2016. A new species of freshwater turtle of the genus *Elseya* (Testudinata: Pleurodira: Chelidae) from the Northern Territory of Australia. *Zootaxa* 4061:018–028.
- VAN DIJK, P.P., IVERSON, J.B., RHODIN, A.G.J., SHAFFER, H.B., AND BOUR, R. 2014. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution, with Maps and Conservation Status. In: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Bulhmann, K.A., Iverson, J.B., and Mittermeier, R.A. (Eds). *Conservation Biology of Freshwater Turtle and Tortoise: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. Chelonian Research Monographs 5:329–479.
- VOGT, R.C. 1980. New methods for trapping aquatic turtles. *Copeia* 1980:368–371.
- VOGT, R.C. 2008. *Amazon Turtles*. Wust Ediciones, Lima. 104 pp.
- WAGLER, J. 1830. *Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugthiere und Vögel*. Stuttgart und Tübingen, München: J. G. Cotta. vi + 354 pp., 9 pls.
- WALKER, D., MOLER, P.E., BUHLMANN, K.A., AND AVISE, J.C. 1998. Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Animal Conservation* 1:55–60.
- WERNECK, F.P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeographic and perspectives. *Quaternary Science Reviews* 30:1630–1648.
- WERNECK, F.P., GAMBLE, T., COLLI, G.R., RODRIGUES, M.T., AND SITES, J. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American ‘dry diagonal’: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution* 66:3014–

3034.

WESSELINGH, F.P. AND SALO, J.A. 2006. A miocene perspective on the evolution of the Amazon BASIN. *SCRIPTA GEOLOGICA* 133:439–458.

YU, Y., HARRIS, A.J., BLAIR, C., AND HE, X. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 87:46–49.

CAPÍTULO 2

CARVALHO, V. T., VOGT, R. C., RHODIN, A. G. J., MITERMEIER, R. A., HRBEK, T., AND FARIAS, I. P. Redescription of the Geoffroy's Side-necked Turtle *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) with taxonomic revalidation of *Emys depressa* (Merrem, 1820), *Emys viridis* (Spix, 1824) and *Platemys waglerii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Pleurodira: Chelidae). Manuscrito formatado segundo as normas do periódico *Zootaxa*

Redescription of the Geoffroy's Side-necked Turtle *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) with taxonomic revalidation of *Emys depressa* (Merrem, 1820), *Emys viridis* (Spix, 1824) and *Platemys waglerii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Pleurodira: Chelidae)

Corresponding author

E-mail: anfibios.repteis@gmail.com

Authors: CARVALHO, VOGT, RHODIN, MITTERMEIER, HRBEK & FARIAS,

Running title: Redescription of the *Phrynops geoffroanus*

Number of plates: 22

Cited references: 82

High taxon: Reptilia – Testudines

Number of new taxa described in the paper: three

Redescription of the Geoffroy's Side-necked Turtle *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) with taxonomic revalidation of *Emys depressa* (Merrem, 1820), *Emys viridis* (Spix, 1824) and *Platemys waglerii* (Duméril e Bibron, 1835) (Testudines: Pleurodira: Chelidae)

VINICIUS TADEU DE CARVALHO^{1,2*}, RICHARD C. VOGT³, ANDERS G. J. RHODIN⁴,
RUSSEL A. MITTERMEIR⁵, TOMAS HRBEK² & IZENI PIRES FARIAS²

¹ *Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil.*

² *Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil.*

³ *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Campus II, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brazil.*

⁴ *Department of Biology, Earlham College, Richmond, Indiana 47374 USA*

⁵ *Conservation International, 2011 Crystal Drive, Suite 500, Arlington, Virginia 22202*

** Corresponding author. E-mail: anfibios.repteis@gmail.com*

Resumo

A família Chelidae é a mais diversa entre os Pleurodira, atualmente está representada por 58 espécies. O gênero *Phrynops* está amplamente distribuído na América do Sul, inclui atualmente quatro espécies nominais: *Phrynops geoffroanus*, *P. hilarii*, *P. tuberosus* e *P. williamsi*. *P. geoffroanus* apresenta a maior distribuição geográfica entre todos os representantes desta família. Sua história taxonômica iniciou com a descrição original realizada pelo naturalista Alemão August Friederich Schweigger em 1812, que analisou o material proveniente da expedição realizada por Alexandre Rodrigues Ferreira que percorreu entre 1783 e 1792 o território brasileiro. A espécie tem muitas incertezas com relação aos aspectos taxonômicos. Mesmo que diversos autores a décadas contestam sua verdadeira identidade, nenhum trabalho foi desenvolvido até o momento de forma robusta. As relações filogenéticas foram investigadas por vários autores com objetivo de testar seu monofiletismo. Apresentamos os resultados sobre a morfologia, morfometria e relações filogenéticas a partir das coletas em campo realizadas em 15 estados brasileiro. Realizamos a revisão taxonômica de *Phrynops geoffroanus* utilizando material proveniente de populações coletadas ao longo de toda sua distribuição geográfica no Brasil. Redescrevemos *P. geoffroanus* e revalidamos as espécies que atualmente são sinônimos deste táxon.

Palavras-chave: Pleurodira, *Phrynops geoffroanus*, redescrição, América do Sul.

Abstract

The Chelidae family is the most diverse among the Pleurodira, currently it is represented by 58 species. The genus *Phrynops* is widely distributed in South America, currently includes four nominal species: *Phrynops geoffroanus*, *P. hilarii*, *P. tuberosus* and *P. williamsi*. *P. geoffroanus* presents the greatest geographical distribution among all the representatives of this family. Its taxonomic history began with the original description made by the German naturalist August Friederich Schweigger in 1812, who analyzed the material coming from the expedition made by Alexandre Rodrigues Ferreira that traveled between 1783 and 1792 the Brazilian territory. The species has many uncertainties regarding the taxonomic aspects. Even though several authors over the decades dispute their true identity, no work has been developed so far in a robust way. Phylogenetic relationships were investigated by several authors in order to test their monophyly. We present the results on the morphology, morphometry and phylogenetic relationships from the field collections performed in 15 Brazilian states. We performed the taxonomic revision of *Phrynops geoffroanus* using material from populations collected throughout its geographic distribution in Brazil. We redraw *P. geoffroanus* and revalidamos the species that are currently synonymous with this taxon.

Key Words: Pleurodira, *Phrynops geoffroanus*, redescription, South America.

Introdução

Entre os Pleurodira, a família Chelidae Gray, 1825 é a mais diversificada desta subordem, inclui as tartarugas *Side-necked* de água doce, aquáticas e semi-aquáticas de pequeno a grande porte (Rueda-Almonacid *et al.* 2008; Pough *et al.* 2008), atualmente a família está representada por 58 espécies, todas restritas ao hemisfério sul (Van Dijk *et al.* 2014; Thomson *et al.* 2015; Uetz *et al.* 2016). As espécies desta família são caracterizadas por possuir um pescoço que dobra em plano horizontal em forma de “S”, os quelídeos tem o pescoço muito longo, crânio achatado, cabeça larga e a pélvis fusionada a carapaça (Restrepo & Páez 2012).

No continente Sul-americano esta família está representada por sete gêneros: *Acantochelys* Gray, 1873; *Chelus* Dumeril, 1805; *Hydromedusa* Wagler, 1830; *Mesoclemmys* Gray, 1873, *Phrynops* Wagler, 1830; *Platemys* Wagler, 1830 e *Rhinemys* Wagler, 1830, distribuídos desde o norte da Venezuela até o norte da Argentina e Uruguai (Pritchard 1979; Ernest & Barbour 1989; Iverson 1992; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Van Dijk *et al.* 2014).

O gênero *Phrynops* é endêmico da América do Sul, atualmente inclui quatro espécies nominais: *P. hilarii* (Dumeril & Bibron 1835) e *P. williamsi* Rodhin e Mittermeier, 1983 com distribuição restrita ao sul da América do Sul, *P. tuberosus* (Peter, 1870) Escudo das Guianas e *P. geoffroanus* (Schweigge, 1812) com ampla distribuição na América do Sul (McCord *et al.* 2001; Van Dijk *et al.* 2014).

Phrynops geoffroanus tem o histórico taxonômico mais confuso de todas as espécies da família Chelidae, e ao menos vários sinônimos estiveram associados a este táxon, devido aos dados de campo mal registrados e que se encontram na literatura (Wermuth & Mertens 1977; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Uetz *et al.* 2016). Atualmente o nome da espécie tem sido aplicado em todas as populações que ocorrem ao longo de sua distribuição geográfica, uma das prováveis razões para tão grande abrangência é que na verdade este táxon não é uma única espécie (Vogt 2008). Diversos autores tem contestado sua taxonomia e considerado *P.*

geoffroanus como um complexo de espécies crípticas que pode ser fracionada em entidades taxonomicas distintas (Rhodin & Mittermeier 1983; Rueda–Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008; Schneider *et al.* 2011; Friol 2014).

Nas últimas décadas a compreensão dos limites das espécies e a nomenclatura geral da família Chelidae melhorou enormemente (Thomson & Georges 2016), tendo como ponto mais importante a evidencia crescente para a monofilia recíproca das radiações sul-americanas e australianas destas tartarugas pleurodiras (Seddon *et al.* 1997; Georges *et al.* 1998).

As relações filogenéticas entre os membros desta família foram investigados por diversos autores (e.g Seddon *et al.* 1997; Shaffer *et al.* 1997; Georges *et al.* 1998; Guillon *et al.* 2012) com base em dados moleculares para testar seu monofiletismo, o mesmo tem ocorrido para o gênero *Phrynops* (e.g., Shaffer *et al.* 1997; Fujita *et al.* 2004; Krenz *et al.* 2005; Shaffer & Thomson 2007; Friol 2014), porem, as relações sistemáticas entre suas populações ainda são escassas. No entanto, recentemente Friol (2014) realizou um estudo sobre a filogenia e evolução das espécies do gênero *Phrynops* utilizando dados morfométricos, osteológicos e moleculares de populações provenientes de distintas bacias hidrográficas do Brasil.

Além das relações filogenéticas das populações que compõem o complexo *P. geoffroanus* permanecerem insuficientemente esclarecidas, a taxonomia da espécie no momento continua insatisfatória, apesar de McCord *et al.* (2001) terem revisado e investigado as afinidades entre as espécies de tartarugas agrupadas no gênero *Phrynops*. Mesmo que diversos autores tenham sugerido ao longo de décadas que *P. geoffroanus* seja um complexo de espécies (e.g Rhodin & Mittermeier 1983; Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Schneider *et al.* 2011; Friol 2014), evidências sobre a identidade taxonômica de espécies adicionais nunca foram apresentadas de forma robusta.

Estudos utilizando abordagens moleculares tem demonstrado subestimação da diversidade em diversos organismos amplamente distribuídos e que são reconhecidos como um único táxon (e.g. Guicking *et al.* 2009; Fouquet *et al.* 2014; Gehara *et al.* 2014; Rojas *et al.*

2014; Shamblin *et al.* 2015; Guarnizo *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2016), auxiliando a taxonomia moderna e designando unidades populacionais para a gestão e conservação (Georges e Thomson 2010; Huebinger *et al.* 2013; Iverson *et al.* 2013; Spinks *et al.* 2014; Shamblin *et al.* 2015).

A maior dificuldade em delimitar espécies nas populações nomeadas como *P. geoffroanus* consiste na falta de espécimes provenientes de sua extensa distribuição geográfica, dificultando estabelecer os padrões de cada população e quantificar as diferenças morfométricas, morfológicas e genéticas entre elas (Rueda-Almonacid *et al.* 2007). Outra problemática está relacionada ao estado de conservação do espécime tipo, o que dificulta a comparação de caracteres morfométricos e morfológicos.

Nas últimas décadas o conhecimento sistemático acerca dos quelídeos vem progredindo consideravelmente com descrições de novas espécies devido ao advento de técnicas moleculares (e.g. McCord & Thomson 2002; Bour & Zaher 2005; Thomson, Georges & Limpus 2006; McCord & Joseph-Ouni 2007; Thomson & Georges 2009; Thomson, Amepou, Anamiato & Georges 2015; Thomson & Georges, 2016), visando distinguir populações geograficamente distantes através de análises utilizando marcadores mitocondriais, nucleares e ainda por meio de dados morfológicos.

No presente estudo, amostramos toda distribuição geográfica de *P. geoffroanus* no Brasil para investigar diversidade intraespecífica utilizando dados moleculares. Propomos uma nova hipótese para as populações contidas neste complexo de espécies, realizamos análises morfométricas e morfológicas. Redescrevemos a espécie e revalidamos as espécies que atualmente são consideradas sinônimos de *P. geoffroanus*. A partir dos nossos resultados elaboramos um novo panorama sobre a distribuição geográfica das linhagens observadas que compõem este complexo.

Breve história taxonômica de *Phrynops geoffroanus*

Phrynops geoffroanus foi descrito no início do século XIX pelo naturalista alemão August Friederich Schweigger durante a revisão dos quelônios do *Muséum National d'Histoire Naturelle* em Paris, o material analisado por Schweigger era proveniente da expedição “Viagem Filosófica” ocorrida no final do século XVIII e que foi chefiada pelo naturalista Luso-Português Alexandre Rodrigues Ferreira, que percorreu as regiões menos conhecidas do Brasil, a Amazônia e todo o norte de Mato Grosso chamado de estado do Grão Pará, Rio Negro e Capitania de Mato Grosso e Cuiabá (Cunha 1991; Bour 2008a; Ceriaco & Bour, 2012).

Este estudo resultou em sua famosa obra “*Prodromus Monographiae Cheloniorum*”, onde Schwiegger descreveu 24 espécies novas e onde consta a descrição original de *Emys geoffroana* Schweigger, 1812 (= *Phrynops geoffroanus*), descrição baseada em poucos caracteres morfológicos (McCord *et al.* 2001; Bour 2008a; Bour 2008b), no entanto, a maior incógnita por trás deste táxon trata-se da imprecisão da sua localidade tipo a qual atualmente encontra-se designada para “Brazilia” referindo-se ao Brasil (Bour 2008a; Bour 2008b; Ceriaco & Bour 2012; Uetz *et al.* 2016).

De acordo com Ceriaco & Bour (2012), utilizando fontes históricas a maioria inéditas e ainda analisando e comparando as características taxidérmicas dos espécimes depositados no *Muséum National d'Histoire Naturelle*, foi possível traçar claramente a origem do material. Ficou evidente que os espécimes levados para Paris são provenientes do extinto Gabinete Real de História da Ajuda em Lisboa e foram coletados durante a expedição “Viagem Filosófica” de A. R. Ferreira. Provavelmente a etiqueta que constava as informações sobre a localidade tipo da espécie se perdeu ou foi propositadamente removida em meados de 1808 durante a invasão napoleônica em Portugal (Bour 2008a). Segundo os relatos de Bour (2008a) e Ceriaco & Bour (2012) o material foi transportado para Paris por Etienne Geoffroy Saint-Hilarie o qual foi homenageado por Schweigger em 1812 na descrição desta espécie.

Material e métodos

Amostragem

Entre os anos de 2010-2015, espécimes de *Phrynops Geoffroanus* foram coletados em 23 localidades ao longo da distribuição geográfica do táxon no Brasil (Figura 1, Anexo 1). Os espécimes foram coletados em diferentes habitats aquáticos (Anexo 1).

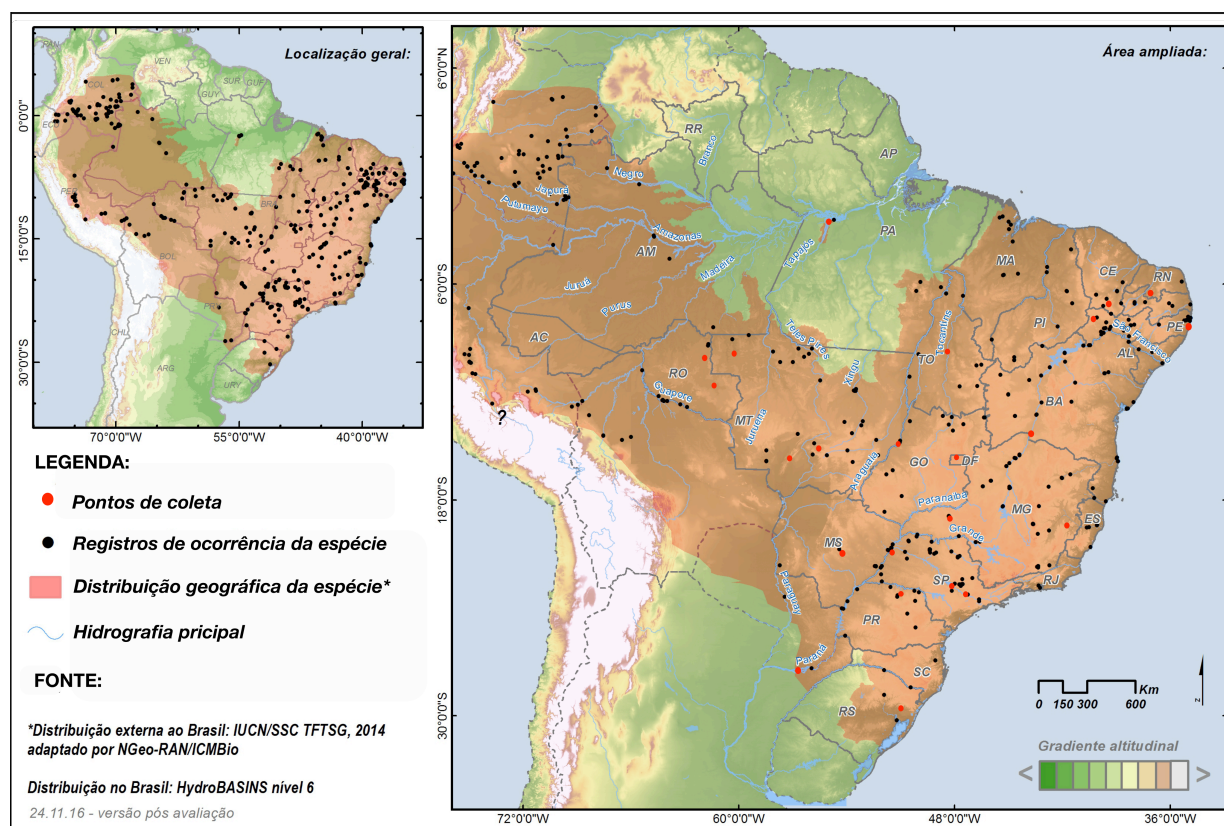


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica atual de *Phrynops Geoffroanus*, elaborado na última avaliação dos quelônios continentais RAN/ICMBio/IUCN/2016. Círculos preto, locais de ocorrência, círculos vermelho localidades amostradas.

Coleta de espécimes

Capturamos os espécimes utilizando seis métodos complementares: busca ativa e captura com puçá (1,5 m de diâmetro); armadilhas de anzol nº 06 sem ferrão (linha de 0,50 mm), contendo carne bovina como isca; malhadeiras *Trammel net* (Vogt 1980), com duas malhas externas e uma interna, 100m de comprimento por 2 m de largura; rede de espera, com

malhadeira de 70 mm entre nós opostos; armadilhas *Hoop traps* (Legler 1960), com uma ou duas entradas e isca de carne bovina.

Coleta de tecidos

Para cada população geneticamente analisada utilizamos entre cinco e 10 amostras de tecido. Foram coletados espécimes de todas as espécies que compõem o complexo *Phrynos geoffroanus* e também de todas as espécies atualmente sinônimos deste táxon. Antes da fixação do material em formol 10%, uma porção de tecido muscular de cada espécime foi retirado da região ventral da coxa. Todos os tecidos foram preservados em álcool comercial 96%, armazenados em freezer a uma temperatura de -10°C. Todo material genético está depositado na Coleção de Tecido de Genética Animal – CTGA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Percurso realizado pela expedição “Viagem Filosófica”

Realizamos um investigação histórica dos caminhos percorridos por Alexandre Rodrigues Ferreira durante a expedição Viagem Filosófica com o objetivo de esclarecer de onde o espécime tipo foi realmente coletado. Encontramos na obra de Cunha (1991) um mapa que ilustra todo trajeto percorrido e as bacias hidrográficas por onde a expedição passou (Figura 2).

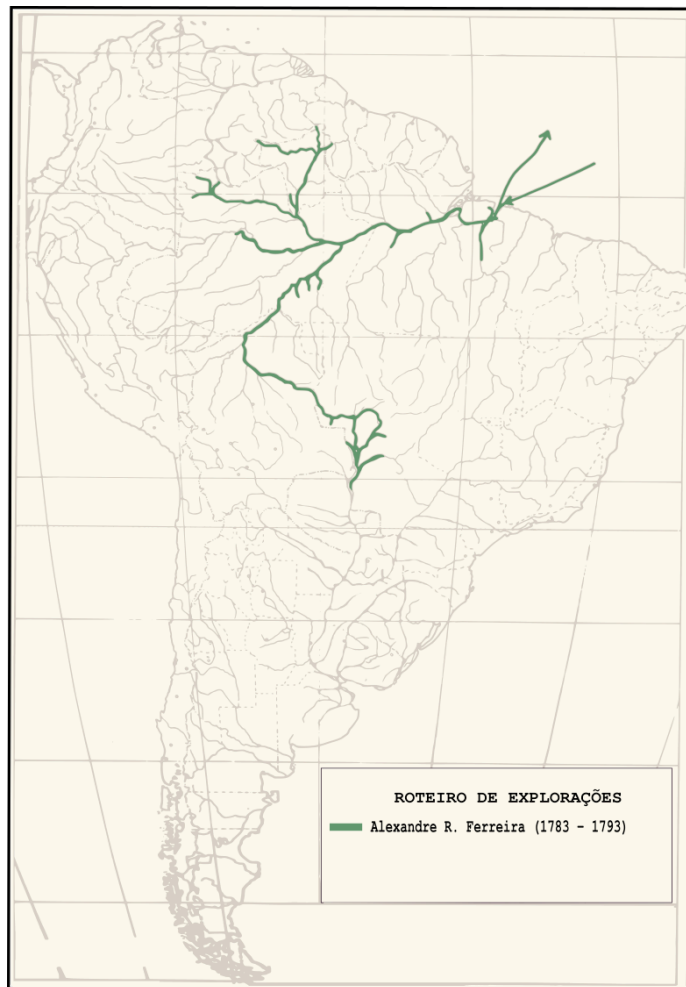


Figura 2. Mapa do trajeto percorrido durante a “Expedição Viagem Filosófica” de Alexandre Rodrigues Ferreira. Retirado e modificado de Cunha (1991).

Revisão taxonômica

A revisão taxonômica compreendeu todas as populações reconhecidas atualmente como *P. geoffroanus* distribuídas pelo Brasil. Com auxílio de um paquímetro analógico com precisão de 0,05 mm, foram tomadas medidas de todos os espécimes coletados seguindo a metodologia apresentada por McCord *et al.* (2001) e Bour & Zaher (2005). Os caracteres morfométricos estão apresentados mais adiante em dados morfométricos.

Além de analisar todas as populações distribuídas pelo Brasil utilizamos as descrições originais das espécies que compõem o complexo *P. geoffroanus* (*P. hilarii*, *P. tuberosus* e *P. williamsi*) e das espécies que atualmente são sinônimos deste táxon (*Emys depressa*, *E. viridis* e *Platemys waglerii*).

Com o propósito de esclarecer a sistemática do complexo de espécies *Phrynops geoffroanus* e o status taxonômico de *Emys depressa* (= *Phrynops depressa*) é necessário ter clareza sobre as características diagnósticas das populações que compõem este complexo, iremos determinar um neótipo para *P. depressa*. Neótipos (Art. 75 / 75.1, 75.3, 75.4 ICZN) são designados quando existe a necessidade excepcional de esclarecer o status taxonômico de um táxon. Diante da imprecisão da localidade tipo; da inexistência de uma série tipo (holótipo) que provavelmente se perdeu ou foi destruído, e da impossibilidade de rastrear o holótipo a partir da única ilustração da espécie, nós designamos um neótipo para o Sudeste do Brasil para a espécie descrita em Merrem (1820). Este neótipo está depositado na Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Delimitação Molecular de Espécies

Nós seguimos as propostas de Dayrat (2005); Padial *et al.* (2012) em usar espécies candidata confirmada (CCS) para linhagem genealógicas profundas que podem ser consideradas boas espécies seguindo padrões de divergências genéticas baseada em distância genética ($\geq 1\%$) (Reid *et al.* 2011).

Coleta de dados

Dados moleculares

O DNA genômico foi extraído de tecido muscular usando proteinase K, conforme o protocolo de fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989). A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram quantificadas por meio de espectofotômetro NanoDrop 2000, para verificar a concentração e qualidade do DNA.

Os fragmentos parciais dos genes 16S mtDNA, Citocromo b (Cytb) e Citocromo oxidase I (COI) foram amplificados por PCR, utilizando a combinação dos seguintes *primers*,

respectivamente: 16Sar(L) e 16Sbr(H) (Palumbi 1996), L14725 (Pääbo 1990), H 15573 (Taberlet *et al.* 1992) e LturtCOIa, HturtCOIa (Reid *et al.* 2011).

As condições de amplificação da PCR para cada *primer* foram as seguintes: **16S** — 92°C (1 min), 35 ciclos de 92°C (1 min), 50°C (40 s), 72°C (90 s), 72°C (5 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 12 µL que continha, 4.8 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de dNTPs (10 mM), 1.25 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM KCl₂), 1 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL); **Citocromo b** — 95°C (1 min), 35 ciclos de 95°C (10 s), 48°C (30 s), 72° C (40 s), 72°C (7 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 15 µL que continha, 6.2 µL ddH₂O, 1.8 µL de 25 mM MgCl₂, 1.5 µL de dNTPs (10 mM), 1.2 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (KCl₂), 1.5 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL); **COI** — 95°C (5 min), 35 ciclos de 95°C (45 s), 54°C (45 s), 72°C (45 s), 72°C (6 min). O volume final do mix das reações da PCR foi de 12 µL que continha, 4.8 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de dNTPs (10 mM), 1.25 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM KCl₂), 1 µL da solução de 2 mM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 1 µL de DNA (50 ng/µL). Os produtos da PCR foram purificados com ExoSap seguindo instruções do fabricante (ThermoFisher.com). As reações de sequenciamento dos produtos de PCR para os três genes foram realizados utilizando o kit Big Dye Terminator conforme as especificações do fabricante (Life Thecnologies). Os *primers* da amplificação foram utilizados para sequenciamento bidirecional. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado em etanol e EDTA e ressuspendido em 10 µL de formamida para ser sequenciado automaticamente usando ABI 3500 (Life Thecnologies).

Obtivemos um total de 1843 pares de base dos genes 16S rDNA (511 pb), Cytb (562 pb) e COI (770 pb) de um total de 101 espécimes de *P. geoffroanus* com os quais foram realizada as análises. Adicionalmente obtivemos sequências do GenBank de *Phrynops hilarii* (Lourenço *et al.* 2012).

Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa *Geneious* 8.1.8 (Kearse *et al.* 2012), usando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1994). As sequências finais foram concatenadas e incorporadas em uma matriz geral no formato CodonCode Aligner v.3.5.2 (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>). Nós selecionamos os melhores modelos de substituição (considerando ajuste à base de dados) usando jModeltest (Guidon & Gascuel 2003; Posada 2008).

A análise filogenética de Inferência Bayesiana foi produzida pelo programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Roquist *et al.* 2001) e consistiu de quatro cadeias de MCMC – Markov Chain Monte Carlo de 10×10^7 gerações com frequência de amostragem a cada 10.000 gerações. A convergência dos valores de ESS – Effective Samples Size (> 900) das corridas foram verificados usando o programa Tracer v1.4 (Rambaut *et al.* 2007), sendo que 10% das árvores obtidas antes do estado estacionário foram descartadas como *burn-in*. Também realizamos análises filogenéticas utilizando os algoritmos de Máxima Verossimilhança que foram inferidas utilizando o programa PhyML 3.0 (Guidon *et al.* 2010). O suporte filogenético foi avaliado através de 1.000 replicações non-parametric bootstrap (Felsenstein 1985). Adicionalmente, calculamos as distâncias não corrigidas (p-distâncias) intra e interespecíficas no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).

Dados morfométricos

Examinamos 204 espécimes (adultos e juvenis), todos depositados na coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Obtivemos fotografias dos holótipos de *Phrynops geoffroanus* e das espécies que atualmente são sinônimos deste táxon. Utilizamos nas análises espécimes de *Emys depressa* (= *Phrynops viridis*) coletados no rio Carinhanha, município de Carinhanha, estado da Bahia (localidade-tipo), *Emys depressa* (= *Phrynops depressa*) coletados no rio Manhuaçu, município de Caratinga, estado de Minas

Gerais, *Platemys waglerii* (= *Phrynops waglerii*) coletados no rio Piracicaba, município de Piracicaba, estado de São Paulo e *Phrynops williamsi* coletados rio Cadeia, município de Picada Café (localidade-tipo).

Foram utilizadas 34 variáveis morfométricas não correlacionadas e com valores proporcionais ao comprimento da carapaça. As análises foram conduzidas separadamente para machos e fêmeas, e indivíduos jovens foram excluídos. Para a redescrição da morfologia externa foram utilizados machos e fêmeas adultos, que foram sexados através de análises gonadal, as medidas adotadas seguiu MacCord *et al.* (2001) e Bour & Zaher (2005).

As variáveis utilizadas foram as seguintes: 1) Comprimento da cabeça (CCB), da margem posterior da mandibular até a ponta do focinho; 2) Largura da cabeça (LCB), entre a articulação da mandíbula; 3) Altura da cabeça (ACB), da parte inferior até a posterior na região mediana da cabeça; 4) Largura inter-orbital (LIO), entre a região anterior dos olhos; 5) Comprimento da carapaça (CCA), da ponta da primeira escama marginal até a porção posterior da escama anal; 6) Largura da carapaça (LCA), da região média do corpo; 7) Altura da carapaça (ACA), da região média do corpo entre o meio do Plastrão e meio da carapaça; 8) Comprimento da 1ª escama vertebral (CEV1), da porção anterior a posterior da 1ª escama vertebral; 9) Comprimento da 2ª escama vertebral (CEV2), da porção anterior a posterior da 2ª escama vertebral; 10) Comprimento da 3ª escama vertebral (CEV3), da porção anterior a posterior da 3ª escama vertebral; 11) Comprimento da 4ª escama vertebral (CEV4), da porção anterior a posterior da 4ª escama vertebral; 12) Comprimento da 5ª escama vertebral (CEV5), da porção anterior a posterior da 5ª escama vertebral; 13) Largura da 1ª escama vertebral (LEV1), da porção esquerda até a direita da 1ª escama vertebral; 14) Largura da 2ª escama vertebral (LEV2), da porção esquerda até a direita da 2ª escama vertebral; 15) Largura da 3ª escama vertebral (LEV3), da porção esquerda até a direita da 3ª escama vertebral; 16) Largura da 4ª escama vertebral (LEV4), da porção esquerda até a direita da 4ª escama vertebral; 17) Largura da 5ª escama vertebral (LEV5), da porção esquerda até a direita da 5ª escama vertebral; 18)

Comprimento mínimo do plastrão (CPMi), da ponta anterior da escama gular até ponta anterior da escama anal; 19) Comprimento máximo do plastrão (CPMa), da ponta anterior da escama gular até ponta posterior da escama anal; 20) Largura do plastrão (LPL), da porção mediana entre a fenda esquerda e direita do plastrão/carapaça; 21) Largura da ponta anterior do plastrão (LPAP), da ponta da escama gular; 22) Largura da ponta posterior do plastrão (LPPP), da ponta da escama anal; 23) Largura da escama gular/humeral (LGH1), da ponta posterior da gular com a junção com a escama humeral; 24) Largura da escama gular/humeral (LGH2), da ponta posterior da gular com a junção com a escama humeral; 25) Largura da escama gular/humeral (LGH3), da ponta posterior da gular com a junção com a escama humeral; 26) Largura da escama femoral/anal (LPFA), entre a fenda femoral/anal; 27) Comprimento da escama inter-gular (CEIG), da porção anterior a porção posterior da escama gular; 28) Comprimento da escama inter-humeral (CEIH), da porção anterior a porção posterior da escama humeral; 29) Comprimento da escama inter-peitoral (CEIP), da porção anterior a porção posterior da escama peitoral; 30) Comprimento da escama inter-abdominal (CEIAB), da porção anterior a porção posterior da escama abdominal; 31) Comprimento da escama inter-femural (CEIF), da porção anterior a porção posterior da escama femural; 32) Comprimento da escama inter-anal (CEIA), da porção anterior a porção posterior da escama anal; 33) Largura do médio plastrão anterior (LMPA), da região mediana anterior do plastrão; 34) Largura do médio plastrão posterior (LMPP), da região mediana anterior do plastrão.

Análises morfométricas

Para as análises morfométricas foram examinados somente os espécimes adultos, 153 no total (75 machos e 78 fêmeas) de *Phrynops geoffroanus*. Para testar a variação morfométrica entre linhagens foi utilizada Análise Discriminante de Componentes Principais - DAPC (Jombart *et al.*, 2010), separadamente por sexo. Esse método tem sido descrito como mais eficiente em comparação a PCA tradicional, porque a função discriminante otimiza a variação entre grupos,

enquanto minimiza a variação entre indivíduos dentro de cada grupo. Modelos de DAPC foram implementados no pacote *adeigenet* (Jombart 2008) do R (R Core Team 2011), o qual utiliza *a-scores* para otimizar o número de eixos da PCA retidos pela DAPC. Também foram testadas diferenças em valores de coordenadas principais por indivíduo entre as linhagens, usando uma combinação entre ANOVA e Teste de Tukey.

Dados morfológicos

Foram utilizadas 14 variáveis morfológicas discretas, observadas em 11 indivíduos por linhagem, e codificadas em escala binária, com 0 para ausência e 1 para presença por indivíduo (anexar lista). A variável contínua comprimento proporcional da cabeça foi acrescentada à matriz de dados para evitar sobreposição excessiva de coordenadas principais. Essa variável contribuiu significativamente para a variação morfológica entre as linhagens moleculares, o que foi identificado por meio de uma análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC). O índice de Gower foi utilizado para quantificar as diferenças entre pares de indivíduos. Distâncias Gower são apropriadas para estimar distâncias entre pares de amostras resultantes de variáveis discretas, embora sejam frequentemente correlacionadas a distâncias Euclidianas (Petchey & Gaston 2007).

Análises morfológicas

Para testar a variação morfológica entre linhagens foi utilizada Análise de Coordenadas Principais (PCoA), com grupos de indivíduos formados pela linhagem molecular identificada para cada indivíduo. Os escores produzidos pelos dois primeiros eixos PCoA foram utilizados para identificação gráfica de agrupamentos de indivíduos pertencentes a cada linhagem devido à semelhança morfológica em caracteres discretos. Os escores produzidos pelo primeiro eixo PCoA foram utilizados para testar diferenças morfológicas entre linhagens por uma análise de variância ANOVA. Também foram testadas diferenças em valores de coordenadas principais

entre pares de linhagens, usando teste de Tukey.

Resultados

Análises filogenéticas

As topologias foram obtidas a partir de análises de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML). Foram analisadas 101 amostras de *Phrynops geoffroanus* para três genes mitocondriais: 16S rRNA (511 pb), Cytb (562 pb) e COI (770 pb), totalizando 1843 pares de bases que foram concatenados para análise filogenética. Também foram sequenciadas amostras das espécies *P. tuberosus* e *P. williamsi* para os mesmos genes acima citados. Adicionalmente utilizamos sequências da espécie *P. hylarii* obtidas no GenBank.

Em ambas as análises de BI e ML as relações filogenéticas das linhagens observadas foram congruentes. Na topologia observa-se cinco linhagens das populações reconhecidas como *P. geoffroanus*, associadas a cinco clados: o primeiro, **Clado A** – *Phrynops waglerii* é composto pelas populações agregadas do (Centro-Oeste, Sudeste e Argentina) que pertencem aos biomas Cerrado e Mata Atlântica e ainda pela espécie *P. hylarii* que encontra-se inserida neste clado; O segundo, **Clado B** – *Phrynops geoffroanus* é composto pelas populações agregadas do (Centro-oeste e Norte) que pertencem aos biomas Cerrado e Amazônia; o terceiro, **Clado C** – *Phrynops* sp. é composto pelas populações agregadas do (Centro-oeste e Norte) que pertence ao bioma Amazônia; o quarto, **Clado D** – *Phrynops viridis* é composto pelas populações agregadas do (Nordeste e Centro-Oeste) que pertencem aos biomas Caatinga e Cerrado; o quinto, **Clado E** – *Phrynops depressa* é composto pela população do (Sudeste) que pertencem ao bioma (Mata Atlântica) (Figura 3 e 4).

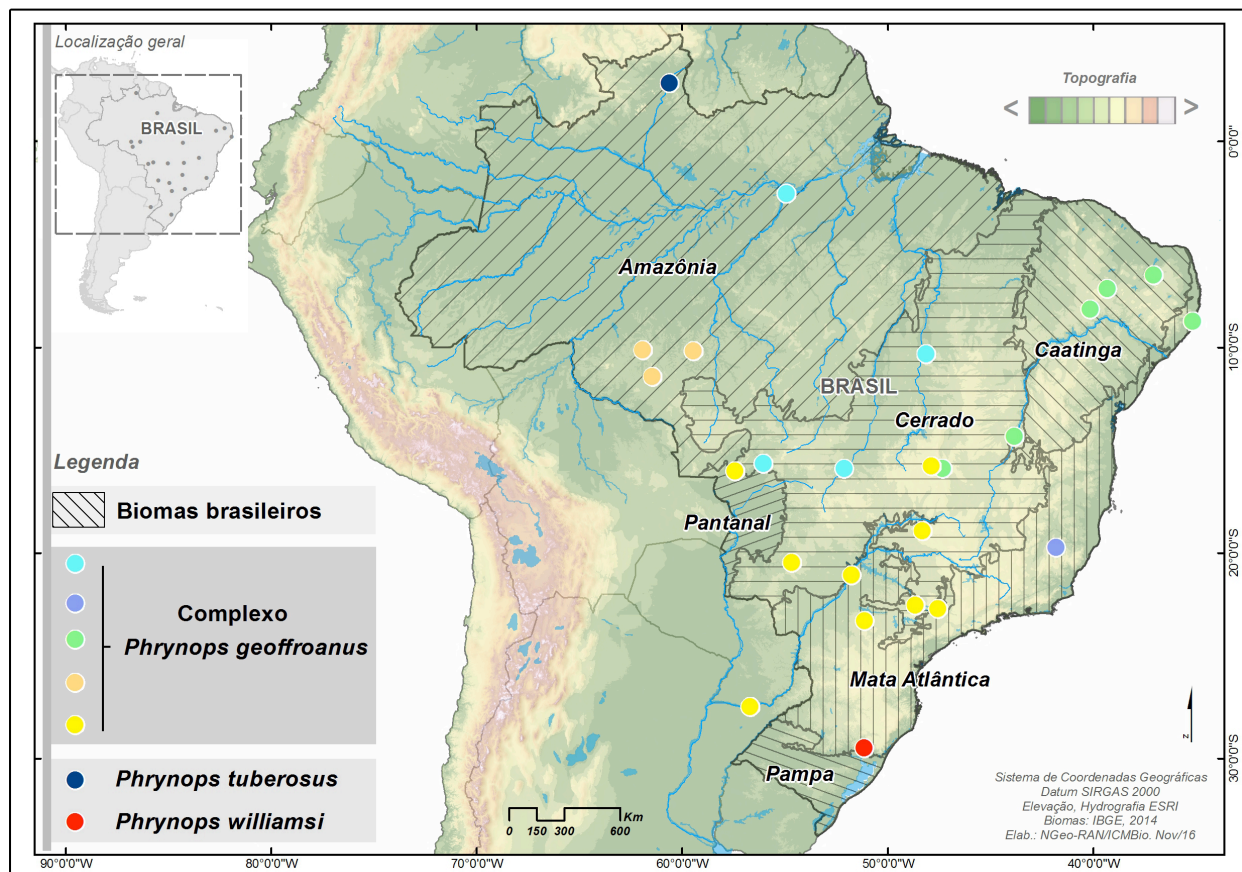


Figura 3. Mapa das linhagens observadas nas populações reconhecidas como *Phrynops geoffroanus*. Hachuras, representam os diferentes biomas brasileiro.

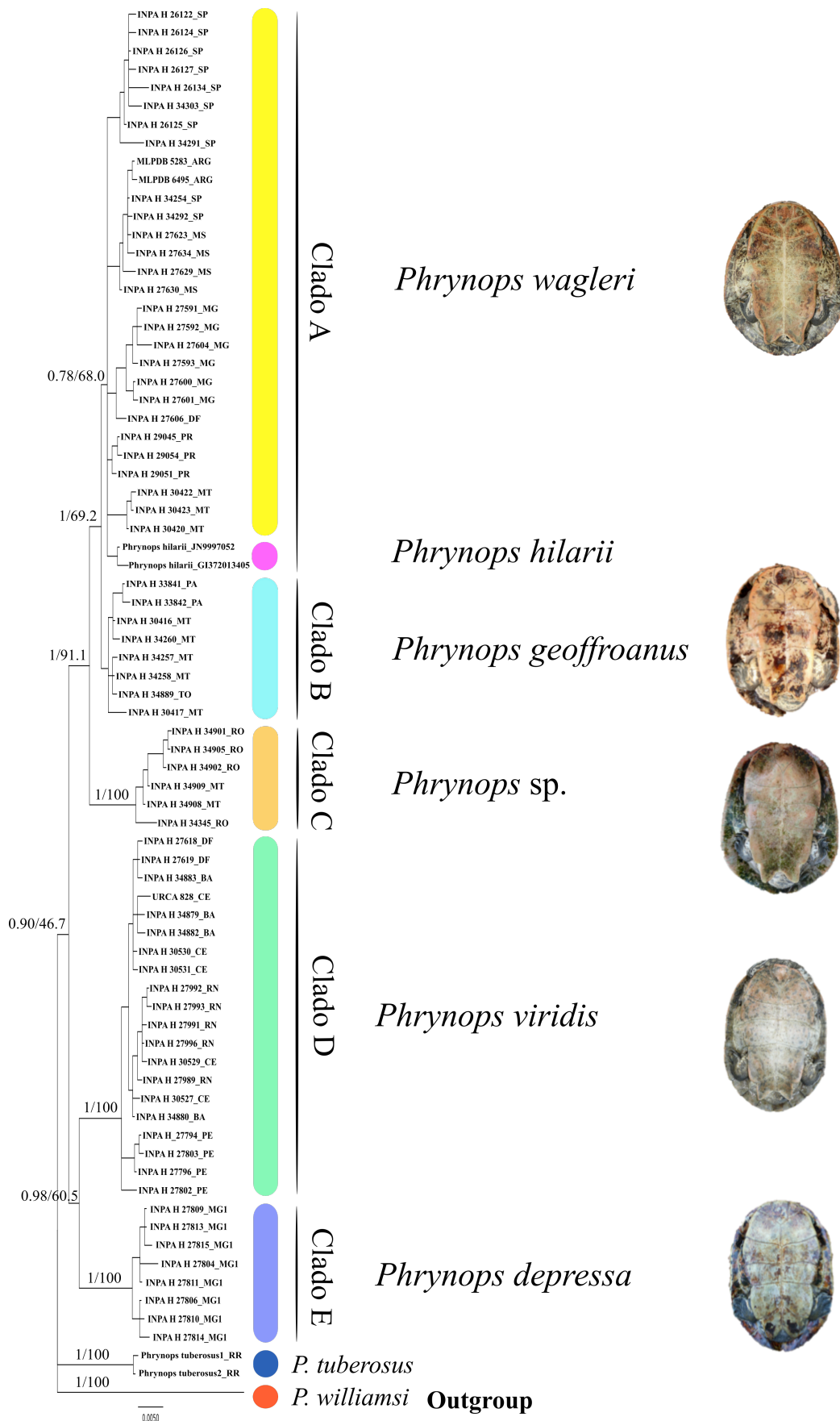


Figura 4. Árvore filogenética de inferência baeyssiana e de máxima verossimilhança do complexo de espécies *Phrynops geoffroanus*.

Os clados apresentados na topologia (Figura 4) que compõem o complexo *P. geoffroanus* formam um grupo monofilético. *Phrynops hilarii* está incluída dentro do complexo *P. geoffroanus* e está mais relacionada as populações do Clado A (Centro-Oeste, Sudeste e Argentina). É notável que os Clados C, D e E apresentaram altos valores de probabilidade posterior e Bootstrap (1/100), enquanto que o Clado A apresentou valores inferiores 95% de pp (Figura 4). No presente estudo *P. williamsi*, posiciona-se como a espécie mais basal entre os representantes deste gênero, com altos valores de probabilidade posterior e bootstrap (1/100). Diante do suporte estatístico expressivo é confiável inferir que *P. williamsi* é a táxon mais basal entre os *Phrynops* corroborando com os resultados de datação do gênero encontrados no estudo de (Carvalho *et al.* em prep.).

Análises morfométricas

A DAPC capturou 92% da variação morfométrica entre fêmeas e 79% entre machos (Figura 5). Para as fêmeas, a variação morfométrica entre linhagens capturada pela DAPC esteve principalmente relacionada ao comprimento da cabeça, o que é evidenciado por 52% de correlação entre essa variável e o primeiro eixo de coordenadas principais ($p < 0.001$). Para os machos, o primeiro eixo de coordenadas principais esteve 29% correlacionado com escudo interno humeral e escudo interno anal ($p < 0.001$ em ambos os casos), sendo essas variáveis as que mais contribuíram para a variação morfométrica entre linhagens.

A DAPC mostrou que os clados representados pelas linhagens A = *Phrynops waglerii*, B = *Phrynops geoffroanus*, C = *Phrynops* sp., D = *Phrynops viridis* e E = *Phrynops depressa* são morfometricamente diferentes entre si, para machos e fêmeas (Figura 5).

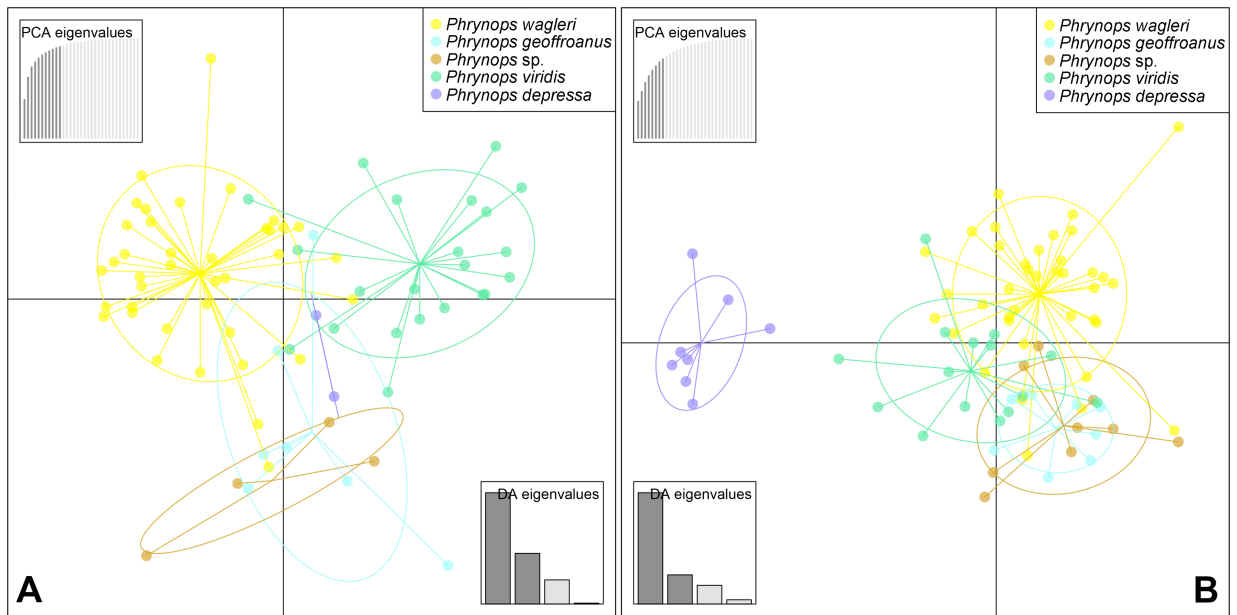


Figura 5. Variação morfométrica entre linhagens definidas por caracteres moleculares de *Phrynops geoffroanus*, com base em 34 caracteres contínuos proporcionais ao comprimento da carapaça. Os eixos X e Y mostram respectivamente o primeiro e segundo eixos de fatores discriminantes descritos por análise discriminante de componentes principais (DAPC). Cores representam diferentes linhagens, pontos representam indivíduos, e grupos são delimitados por uma elipse com 90% de inércia. A = Fêmeas, B = Machos.

Esse resultado foi consistentemente capturado pela ANOVA (Figura 6), a qual mostrou diferença significativa entre componentes principais por linhagem, tanto para fêmeas (ANOVA $F_{4,69} = 32.09$, $P < 0.001$), quanto para machos (ANOVA $F_{4,73} = 65.18$, $P < 0.001$). No entanto, quando comparadas par-a-par (Tabela 1), as diferenças morfométricas entre linhagens diferiram entre fêmeas e machos, embora tenham convergido como diferenças morfométricas significativas entre as linhagens A e D, B e D e C e D.

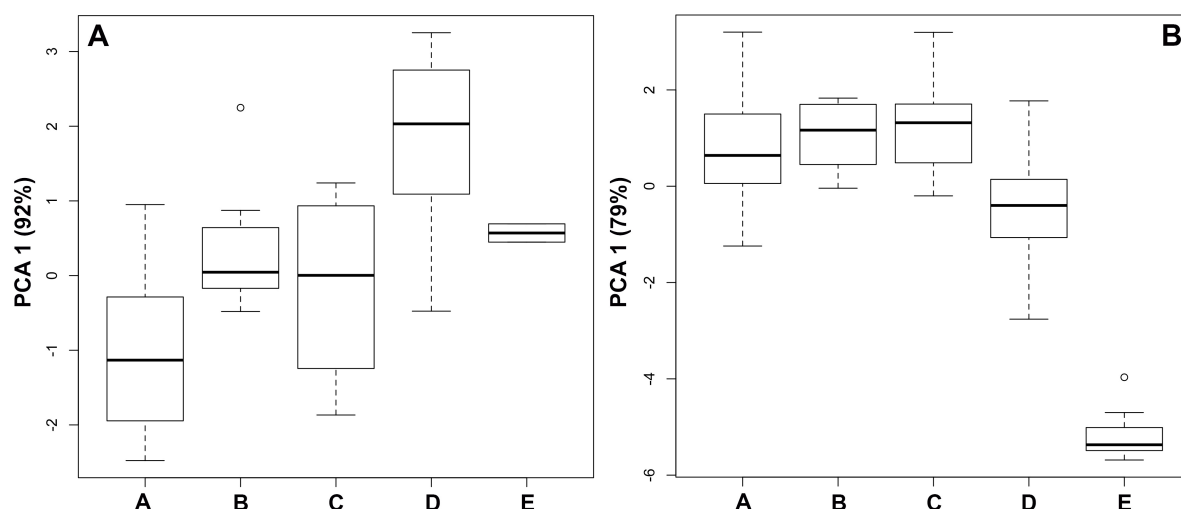


Figura 6. Dispersão de coordenadas principais (PCA 1) representando variação morfométrica em *Phrynops geoffroanus* entre diferentes linhagens identificadas por caracteres moleculares (letras nos eixos X, A = *P. waglerii*, B = *P. geoffroanus*, C = *Phrynops* sp., D = *P. viridis* e E = *P. depressa*). Valores entre parênteses mostram porcentagem de variação capturada pelo primeiro eixo de coordenadas principais em relação às distâncias originais entre indivíduos. A = Fêmeas, B = Machos.

Tabela 1. Sumário de resultados do Teste de Tukey aplicado para comparar a variação morfométrica por sexo entre pares de linhagens de *Phrynops geoffroanus*. Dados morfométricos são representados por coordenadas principais obtidas por uma análise discriminante de componentes principais (DAPC) e as linhagens foram identificadas por caracteres moleculares. Valores em negrito mostram diferenças significativas ($P \leq 0.05$).

Sexo	Comparação entre grupos	Diferença	Intervalo de confiança inferior (95%)	Intervalo de confiança superior (95%)	P
F	B-A	1.52	0.37	2.67	0.003
F	C-A	0.97	-0.49	2.45	0.34
F	D-A	2.99	2.25	3.74	0.0001
F	E-A	1.70	-0.32	3.73	0.14
F	C-B	-0.54	-2.30	1.20	0.90
F	D-B	1.46	0.25	2.68	0.01
F	E-B	0.17	-2.06	2.42	0.99
F	D-C	2.01	0.49	3.54	0.003
F	E-C	0.72	-1.70	3.15	0.91
F	E-D	-1.29	-3.36	0.77	0.41
M	B-A	0.29	-0.79	1.37	0.94
M	C-A	0.42	-0.61	1.46	0.78
M	D-A	-1.20	-2.05	-0.35	0.001
M	E-A	-5.93	-7.02	-4.84	0.0001

M	C-B	0.13	-1.22	1.49	0.99
M	D-B	-1.49	-2.72	-0.27	0.008
M	E-B	-6.22	-7.62	-4.82	0.0001
M	D-C	-1.63	-2.80	-0.45	0.002
M	E-C	-6.35	-7.71	-5.00	0.0001
M	E-D	-4.72	-5.95	-3.50	0.0001

Análises morfológicas

O primeiro eixo PCoA capturou 80% da variação morfológica entre indivíduos (Figura 7), e esteve principalmente correlacionado com a presença ou ausência de estrias na cabeça ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$), presença ou ausência de duas manchas na cauda ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$), presença ou ausência de carapaça oval ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$), presença ou ausência de escama nugal longa ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$), coloração do plastrão ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$) e tamanho dos tubérculos rugosos ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$). O segundo eixo capturou 79% (Figura 7), e esteve principalmente correlacionado com a presença ou ausência de carapaça redonda ($R^2 = 0,91$; $P < 0,001$) e carapaça alongada ($R^2 = 0,91$; $P < 0,001$).

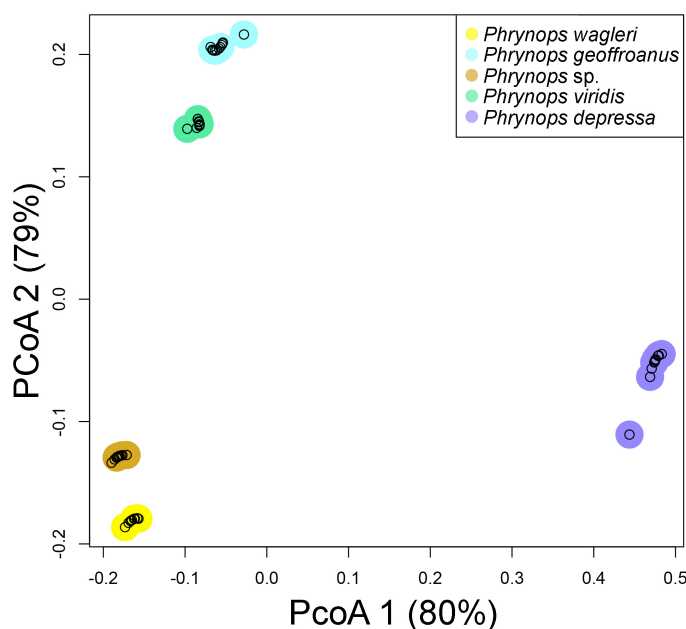


Figura 7. Distribuição espacial de coordenadas principais representando indivíduos de *Phrynops geoffroanus* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas identificadas por dados moleculares.

Os eixos PCoA foram obtidos a partir de 14 variáveis morfológicas discretas e uma contínua. Cada grupo (linhagem) é representado por 11 indivíduos.

Uma análise visual da espacialização das coordenadas principais produzidas pelos dois primeiros eixos da PCoA revelou que os indivíduos foram consistentemente agrupados por semelhanças morfológicas, de acordo com as linhagens identificadas por dados moleculares. Esse resultado foi suportado pela ANOVA (Figura 8), a qual revelou diferenças morfológicas significativas entre as linhagens ($F_{4-49} = 13269$; $P < 0,001$), e pelo teste de Tukey, cujos resultados se encontram sumarizados na Tabela 2.

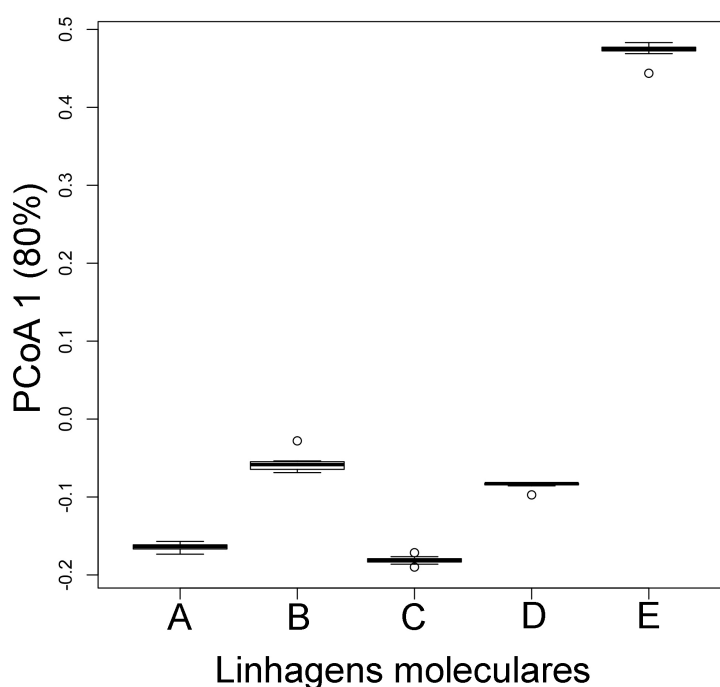


Figura 8. Variação morfológica entre linhagens definidas por caracteres moleculares de *Phrynops geoffroanus*, com base em 14 caracteres discretos e um contínuo. Os eixo Y mostra coordenadas principais obtidas por uma PCoA aplicada sobre uma matriz de distâncias Gower entre pares de indivíduos. (A = *P. waglerii*, B = *P. geoffroanus*, C = *Phrynops* sp., D = *P. viridis* e E = *P. depressa*).

Tabela 2. Sumário de resultados do teste de Tukey aplicado para comparar a variação morfológica entre pares de linhagens de *Phrynops geoffroanus*. Dados morfológicos são representados por coordenadas principais obtidas por uma PCoA, e as linhagens foram identificadas por caracteres moleculares.

Comparação entre grupos	Diferença	Intervalo de confiança inferior (95%)	Intervalo de confiança superior (95%)	P
A-B	0,10	0,09	0,11	< 0,001
A-C	-0,01	-0,02	-0,007	< 0,001
A-D	0,07	0,07	0,08	< 0,001
A-E	0,63	0,62	0,64	< 0,001
B-C	-0,12	-0,13	-0,11	< 0,001
B-D	-0,02	-0,03	-0,01	< 0,001
B-E	0,53	0,52	0,53	< 0,001
C-D	0,09	0,08	0,10	< 0,001
C-E	0,65	0,64	0,66	< 0,001
D-E	0,55	0,54	0,56	< 0,001

SISTEMATICA

Ordem Testudines Linnaeus, 1758

Subordem Pleurodira Cope, 1864

Família Chelidae Gray, 1825

Subfamília Chelinae Gray, 1825

Gênero *Phrynops* Wagler, 1830

Redescrição

Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812)

Sinonímicos

Emys geoffroana Schweigger, 1812. Königsberg. Arch. Naturwiss., 1:302. Holótipo: MNHN

9417 Localidade tipo: (“Brazilia” = Brazil).

Emys depressa Merrem, 1820. (sênior homonym). [non *Emys depressa* Spix, 1824 = *Acanthochelys spixii* (Duméril & Bibron, 1835)], Tentam. Syst. Amphib.: 22. Localidade tipo: Estado do Rio de Janeiro, Brasilien

Emys viridis Spix, 1824. Anim. Nova. Spec. Nov. Testud. Brasil.: 3; plate 2: fig. 3, palte 3: fig. 1. Localidade tipo: Rio Carinhanhae, tributário do Rio São Francisco, Brazil.

Emys tritentaculata Saint-Hilarie in Cuvier, 1829: 11. (nomen nudum et dubium)

Chelodina geoffroana (Schweigger, 1812). Fitzinger, 1826. Neue Classif. Rept.: 45.

Phrynops geoffroanus Wagler, 1830. Natürl. Syst. Amphib.: 136.

Chelys (Hydrapsis) depressa – Gray, 1831. In Griffith & Pidgeon, Anim. Kingd. Cuvier, 9, Synops. Spec. Rept.:16.

Chelys (Hydrapsis) viridis – Gray, 1831. In Griffith & Pidgeon, Anim. Kingd. Cuvier, 9, Synops. Spec. Rept.:16.

Emys geoffroyana – Gray, 1831. In Griffith & Pidgeon, Anim. Kingd. Cuvier, 9, Synops. Spec. Rept.:16.

Hydrapsis depressa Gray, 1831. Gray, Synops. Rept., 1 (Cataphracta): 41.

Hydrapsis viridis Gray, 1831. Gray, Synops. Rept., 1 (Cataphracta): 41.

Platemys geoffroana Wagler, 1833. Descr. Icon. Amphib.: plate 26.

Platemys geoffroana Duméril & Bibron, 1835. (ex errore), Erpétol. gén., Hist. Natur. Rept., 2: 418.

Platemys neuwiedii Duméril & Bibron, 1835. (nomen novum pro *Emys depressa* Merrem, 1820), Erpétol. gén., Hist. natur. Rept., 2:245.

Platemys wagleri Duméril & Bibron, 1835, Erpétol. gén., Hist. natur. Rept., 2: 422. Localidade tipo: Brazil.

Hydrapsis (Phrynops) geoffroana Fitzinger, 1835, Ann. Wien. Mus. Naturgesch., 1,

Comentários sobre a espécie. Foi descrita como *Emys Geoffroyana* por Schweigger em 1812, descrição realizada a partir do material proveniente da expedição “Viagem Filosófica” chefiada pelo naturalista Alexandre Rodrigues Ferreira. O material tipo foi levado de Lisboa durante a invasão napoleônica e provavelmente a etiqueta contendo as informações sobre a identificação da localidade-tipo se perdeu durante o transporte do material para Paris. Atualmente a localidade tipo da espécie está designada para “Brasília” referindo-se ao Brasil.

Holótipo (Figura 9). Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, MNHN 9417 (fêmea adulta), localidade tipo “Brasília”, referindo-se ao Brasil.

Descrição do Holótipo. Veja em The Life and Herpetological Contributions of August Frederich Schweigger (1783-1821).

Material Examinado. INPA-H 34257, 34258, 34262, 33841, 33842, 33843, 34892, 34896, 34898, 34899, 34900 (fêmeas); INPA-H 34263, 34894, 34890, 34891, 34897, 34895, 34893 (machos).

Nova diagnose. A espécie é atribuída ao gênero pela combinação dos seguintes caracteres (segundo McCord et al. 2001): cabeça plana e larga; o focinho é rombo; cinco a sete osso neurais; o primeiro osso neural está presente, em contato com o proneural e separa o primeiro par de costais; a carapaça é relativamente plana; a 11 escama marginal são mais largas que as supracaudais; as bordas laterais não são viradas para cima e não são estreitas; a costura inter-anal do plastrão é mais longa do que a costura inter-humeral; as escamas tibiais na região antero-medial não são redondas; os barbelos geralmente são longos. *Phrynops Geoffroyanus* é diagnosticado pela combinação dos seguintes caracteres: 1) região dorsal da cabeça com pintas sequenciais formando estrias irregulares de coloração cinza ou esbranquiçada evidentes que vão do focinho e não ultrapassam a cabeça; 2) região ventral da cabeça com muitas manchas pretas em forma de estrias relativamente abundantes; 3) vista lateral da cabeça possui duas linhas

laterias pretas intercaladas por uma linha branca, a primeira linha preta inicia na ponta do focinho passando pelo olho e tímpano e se estende até a região do pescoço, a linha branca bastante evidente inicia abaixo da narina atravessando o olho, passando por cima do tímpano e vai até o final do pescoço, e a segunda linha preta mais estreita inicia abaixo da mandibular e vai até o final do pescoço; 4) o comprimento da cabeça é 20,9% do comprimento total da carapaça (CCA) para as fêmeas e de 19.6% para os machos ; 5) a carapaça é oval e relativamente aplainada com listras pretas descontínuas bem marcantes tanto nos adultos quanto nos juvenis; 6) a coloração da carapaça é marrom escuro ou claro; 7) o plastrão é predominantemente sem manchas nos adultos, mais nos juvenis elas são evidentes, de coloração preta contrastando com o laranja-avermelhado do plastrão; 8) possui uma quilha evidente nos adultos e raltivamente segmentada nos juvenis; 9) a escama gular é mais larga do que longa; 10) a cauda possui duas listas prestas largas que vão desde a coxa até ponta posterior da cloaca; 11) os membros anteriores e psteriores com poucas manchas variando entre estrias e pintas; 12) a região dorsal do pescoço é rugosa, bastante abundante com tubérculos grandes de coloração esbranquiçada; 13) em vida os machos adultos apresentam tanto as estrias da cabeça quanto os tuberculos do pescoço laranja-avermelhado e os juvenis apresentam o plastão de coloração laranja-avermelhado bem vibrante.

Descrição da morfologia externa. Carapaça: A carapaça é oval e relativamente aplainada com listras pretas irregulares descontínuas bem marcantes tanto nos adultos quanto nos juvenis. A coloração da carapaça é marrom clara a marrom escuro; Os pontos mais anteriores da carapaça estão entre a 1–7 escamas marginais, enquanto que a região mais expandida da carapaça vai da 7–12 marginais. Nos adultos a quilha vertebral é bastante evidente; **Plastrão:** A fórmula do plastrão utilizando a linha mediana é: fem > gul > abd > ana > peit > hum. Predominantemente sem manchas nos adultos e juvenis. A cor do plastrão é Amarela ou Creme. O lobo posterior do plastrão é mais comprido que o anterior. O lobo anterior é marcadamente mais estreito que o posterior.

Tamanho e dimorfismo sexual. As fêmeas desta espécie podem chegar de atingir em média (221.5 ± 52.4 mm), enquanto que os machos atingem até (251.0 ± 55.6 mm). Os maiores espécimes medidos neste estudo são uma fêmea de 302.8 mm e um macho de 278.0 mm.

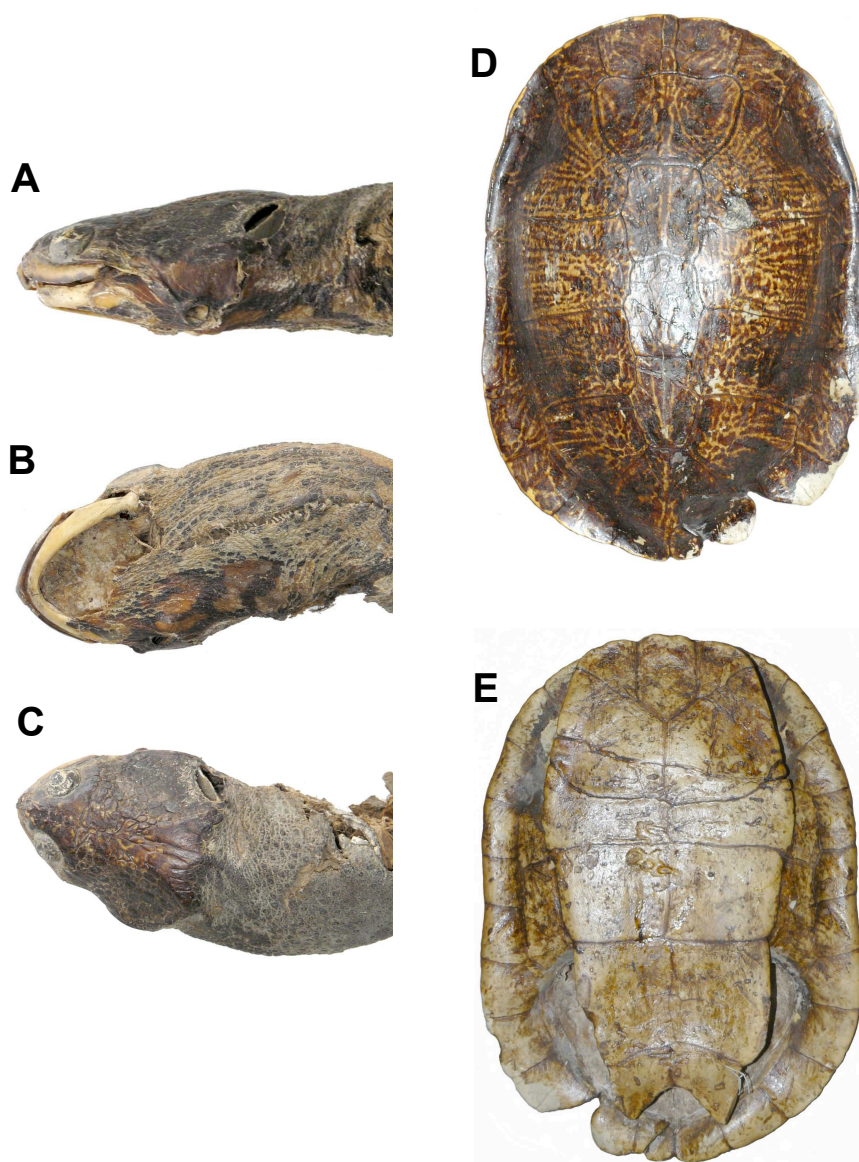


Figura 9. Holótipo de *Phrynops geoffroanus* MNHN 9417. A) vista lateral da cabeça; B) vista ventral da cabeça; C) vista dorsal da cabeça; D) carapaça; E) plastrão. Fotos: Roger Bour.

Comparação com outras espécies. *Phrynops geoffroanus* (Figura 10) se destingue das outras espécies pelos seguintes caracteres (características das outras espécies comparadas entre parênteses).



Figura 10. Espécime de *Phrynops geoffroanus*, macho adulto, coletado no Rio Araguaia, município de Barra do Garças, estado do Mato Grosso. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.

De *Phrynops williamsi* (Figura 11), região dorsal da cabeça com estrias irregulares que vão do focinho e não ultrapassam a cabeça (estrias longitudinais que vão da ponta do focinho até



a região do pescoço); região ventral da cabeça com manchas pretas em forma de estrias relativamente abundantes (listras pretas largas em forma de ferradura); vista lateral com duas linhas laterais pretas intercaladas por uma linha branca (com três linhas laterais largas); a carapaça é oval e relativamente aplainada com listras pretas descontinuas bem marcantes (carapaça pouco aplainada com listras pretas contínuas;

Figura 11. Espécime de *Phrynops williamsi*, macho adulto, coletado no Rio Cadeia, município de Picada Café (Localidade-tipo), estado do Rio Grande do Sul. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente. Fotos: Rafael Balestrin.

De *Phrynops hilarii* (Figura 12), o plastrão é predominantemente sem manchas nos adultos (com manchas em forma de pintas grossas ou ocelos); região dorsal da cabeça com estrias irregulares que vão do focinho e não ultrapassam a cabeça (ausência de estrias na cabeça); a coloração da carapaça é marrom escuro ou claro (coloração cinza ou verde oliva); a carapaça

com listras pretas descontinuas bem marcantes (ausência de listras); vista lateral da cabeça possui duas linhas laterais pretas intercaladas por uma linha branca (uma única linha preta delgada que vai da ponta do focinho até o pescocó)



Figura 12. Espécime de *Phrynops hilarii*, fêmea adulta, coletado no Rio Itajaí-Açu, município de Apiúna, estado de Santa Catarina. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente. Fotos: Tobias Saraiva Kunz, exceto detalhe da cabeça.

De *Phrynops tuberosus* (Figura 13), plastrão é predominantemente sem manchas nos adultos (com manchas pretas nos adultos); a região dorsal do pescoço é rugosa com tubérculos grandes de coloração esbranquiçada (tubérculos preto).



Figura 13. Espécime de *Phrynops tuberosus*, macho adulto, coletado no Rio Cauamé, município de Boa Vista, estado de Roraima. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.

Redescrição. A carapaça é oval e relativamente aplainada com CCA de 221.5 ± 52.4 mm (124.0 – 302.8 mm) para fêmeas adultas e CCA de 251.0 ± 55.6 mm (124.0 – 302.8 mm) para machos adultos;

Varição. A coloração da carapaça é marrom claro ou marrom escuro, a quilha dorsal é evidente em alguns adultos e relativamente segmentada, visível a partir da primeira, segunda ou terceira escama, em alguns juvenis a quilha apresenta-se a partir da primeira escama vertebral, a cauda possui duas listras pretas que vão desde a coxa até a ponta posterior da cloaca, em outros espécimes esta listra estão presentes somente na cauda, a região ventral dos membros anteriores e posteriores com poucas manchas variando entre estrias e pintas, estrias bastante marcante na

maioria dos espécimes em alguns menos marcante, membros anteriores e posteriores com manchas predominantemente na maioria dos espécimes, em outros com menos manchas.

Medidas morfométricas (mm). Média dos espécimes **fêmeas**: CCB 46.3; LCB 40.0; ACB 23.9; LIO 9.2; CCA 221.5; LCA 171.8; ACA 66.1; CEV1 44.1; CEV2 35.2; CEV3 36.6; CEV4 33.4; CEV5 39.6; LEV1 62.4; LEV2 40.8; LEV3 39.2; LEV4 37.9; LEV5 51.3; CPMi 183.0; CPMa 198.7; LPL 135.0; LPAP 77.4; LPPP 47.8; LPGH1 22.4; LPGH2 17.2; LPGH3 46.8; LPFA 59.6; EIG 42.3; EIH 22.8; EIP 23.1; EIAB 28.1; EIF 35.5; EAN 30.6; LPAP 109.3; LPPP 87.7; **machos**: CCB 49.3; LCB 39.2; ACB 24.1; LIO 9.3; CCA 251.0; LCA 185.9; ACA 66.9; CEV1 48.0; CEV2 41.4; CEV3 42.1; CEV4 39.6; CEV5 45.7; LEV1 64.4; LEV2 45.0; LEV3 44.3; LEV4 40.3; LEV5 55.5; CPMi 206.9; CPMa 223.0; LPL 148.8; LPAP 80.5; LPPP 55.7; LPGH1 24.7; LPGH2 17.8; LPGH3 47.7; LPFA 66.2; EIG 41.9; EIH 26.5; EIP 27.2; EIAB 34.6; EIF 45.7; EAN 32.5; LPAP 116.2; LPPP 96.9.

Coloração em preservação. A coloração do material preservado em álcool se perde em algumas regiões do corpo, as mais afetadas foram a região dorsal e ventral da carapaça, os tubérculos da região do pescoço e as estrias da cabeça que desbotaram bastante.

Distribuição geográfica e história natural. *Phrynops geoffroanus* ocorre nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil, nos estados do Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Pará e provavelmente no estado do Maranhão. Não parece estar em simpatria com qualquer outro membro de *Phrynops*. Na região Centro-oeste é facilmente encontrada em pequenos córregos antropizados com cobertura vegetal na região metropolitana de Cuiabá em altas densidades no rios Coxipó e Cuiabá. Nas horas mais quentes do dia são facilmente vistos assoalhando sobre as pedras no leito do rio Coxipó.

Revalidação taxonômica

Emys depressa (Merrem, 1820)

Sinonímicos

Emys depressa Merrem, 1820 [non *Emys depressa* Spix, 1824 = *Acantochelys spixii* (Duméril & Bibron, 1835)], Tentam. Syst. Amphib.:22. – Localidade tipo: Brazil.

Chelys (Hydrapsis) depressa – Gray, 1831 in Griffith & Pidgeon, Anim. Kindg. Cuvier, 9, Synops. Spec. Class Rept.: 16.

Hydrapsis depressa – Gray, 1831. Synops. Rept., 1 (Cataphracta): 41.

Platemys neuwiedii Duméril & Bibron, 1835. (nomen novum pro *Emys depressa* Erpétol. gén., Hist. Natur. Rept., 2: 425.

Platemys depressa Strauch, 1862. Mém. Acad. Impér. Sci. St. Pétersbourg, Sér. 7, 5 (7): 47.

Comentários sobre a espécie. Foi descrita como *Emys depressa* por Merrem em 1820, descrição baseada em poucos caracteres morfológicos. Deve ser mencionado que Duméril & Bibron deu um novo nome, *Platemys neuwiedii* para *Emys depressa* (Wied-Neuwied em Merrem, 1820: 22) retratada por Maximilian Zu Wied-Neuwied (1825: Lieferung 9). Portanto *Emys depressa* (*Platemys neuwiedii*) são atualmente considerados sinônimos subjetivos de *Emys geoffroana* (= *Phrynops geoffroanus*) (Bour, 2008a).

Holótipo. (Figura 14). Este táxon não possui um espécime tipo (holótipo) e a localidade tipo é imprecisa, designada para o Brasil, provavelmente o tipo se perdeu. Existe apenas as pranchas da espécie retratada por Wied-Neuwied, 1822 (pl. 4 e 5).

Descrição do holótipo. Segundo a descrição de Merrem, 1820, a carapaça é elíptica, convexa deprimida, com 13 escudos no meio do corpo; a cabeça é inclinada; os dedos são distintos, com

garras afiadas; bico córneo e o esterno é imóvel; de acordo com Wied-Neuwied, 1822, a carapaça é elíptica com 13 escudos; dois barbilhões curtos sobre o queixo; cinco dedos nas mãos e quatro dedos nos pés; a parte inferior do pescoço com manchas enegrecidas, uma delas sob o queixo em forma de ferradura; o casco de coloração marrom com tiras enegrecidas.

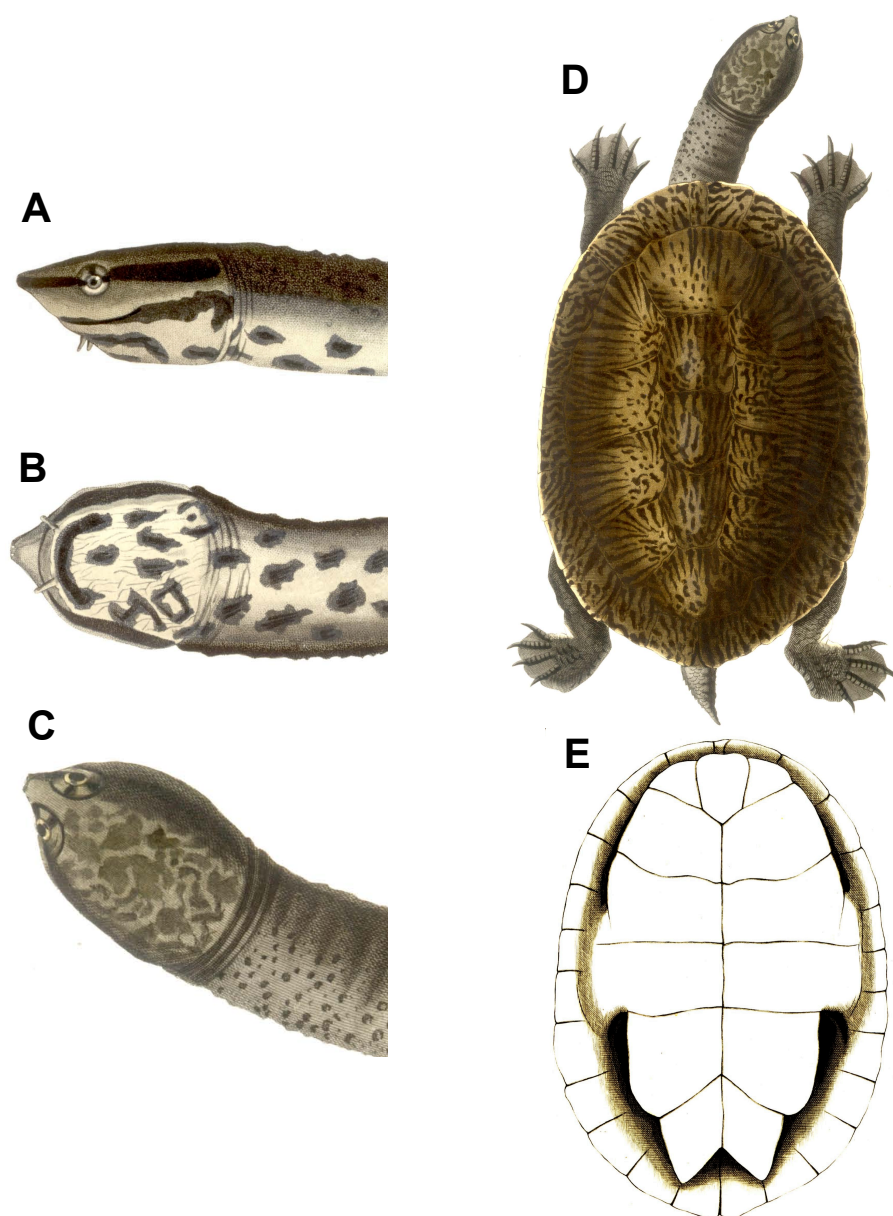


Figura 14. Holótipo de *Phrynops depressa*, ilustração da prancha publicada em Wied-Neuwied (1825). A) vista lateral da cabeça; B) vista dorsal da cabeça; C) vista ventral da cabeça; D) carapaça; E) Plastrão.

Material examinado. INPA-H 27814, 27810 (fêmeas); INPA-H 27806, 27811, 27813, 27807, 27808, 27815, 27816, 27809 (machos).

Determinação de neótipo para *Phrynops depressa*

Phrynops depressa é um táxon que não possui um holótipo (série tipo), somente uma ilustração, e sua localidade tipo é imprecisa, está declarada para o Brasil. Eliminando a possibilidade deste táxon se enquadrar na descrição de outras espécies do gênero comparamos as descrições originais das espécies válidas atualmente e dos sinônimos de *Phrynops geoffroanus*. Confrontando os desenhos das pranchas disponíveis em Wied-Neuwied, 1822 com os espécimes que coletamos no estado de Minas Gerais confirmamos aqui que tratam-se da mesma espécie. Em consequência disso, selecionamos um espécime de Minas Gerais (Mata Atlântica) como neótipo com objetivo de esclarecer o status taxonômico deste táxon.

Neótipo (Figura 15). INPA-H 27809 macho adulto, coletado na Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN Miguel Feliciano Abdala, município de Caratinga, estado de Minas Gerais (19°43'33.3"S; 41°48'07.8"W), coletado em 28/02/2011 por V.T. de Carvalho.

Descrição do neótipo: 1) região dorsal da cabeça com estrias irregulares bem marcantes de coloração acinzentada que vão do focinho até a região do pescoço; 2) região ventral da cabeça com estrias pretas irregulares muito marcantes, arredondadas ou em forma de estrias largas relativamente abundantes; 3) vista lateral da cabeça possui duas linhas laterais pretas intercaladas por uma linha branca, a primeira linha preta inicia na ponta do focinho passando pelo olho e tímpano e se estende até a região do pescoço, a linha branca menos evidente inicia na ponta do focinho abaixo da narina e do olho, passando por cima do tímpano e vai até o final do pescoço, e a segunda linha preta mais estreita e menos evidente que a primeira inicia na porção posterior da mandíbula e vai até o final do pescoço; 4) o comprimento da cabeça é 22,5% do comprimento total da carapaça (CCA); 5) a carapaça é alongada, convexa a partir da segunda escama vertebral, ligeiramente estreita, pouco aplainada, de coloração marrom claro a marrom escuro com estrias pretas irregulares descontinuas relativamente evidentes; 6) a coloração do plastrão é

amarela a amarelo-alaranjado; 7) o plastrão é levemente manchado por pintas ou estrias irregulares; 8) quilha vertebral pouco evidente, segmentada, iniciando a partir da primeira escama vertebral; 9) a escama gular é mais larga do que longa; 10) a cauda possui duas listras pretas bem marcantes que vai da coxa até a ponta da cauda em ambos os lados; 11) os membros anteriores e posteriores com manchas pretas bem marcantes arredondadas; 12) a região dorsal do pescoço é rugosa, com tubérculos pretos e pequenos menos definidos; 13) em vida os machos adultos apresentam tanto as estrias da cabeça quanto os tuberculos do pescoço laranja-avermelhado e os juvenis apresentam o plastrão de coloração laranja-avermelhado bem vibrante.

Variação. A coloração da carapaça é marrom claro ou marrom escuro, a quilha dorsal é pouco evidente e segmentada nos adultos e nos juvenis, iniciando a partir da primeira escama vertebral, ao longo de toda carapaça possui estrias descontínuas presentes nos adultos, sendo que nos juvenis ela é pouco evidente, o plastrão é levemente manchado nos adultos e nos juvenis apresentam pintas pretas irregulares, os membros anteriores e posteriores apresentam manchas pretas bem marcantes nos adultos e menos evidente nos juvenis.

Medidas morfométricas do neótipo (mm). CCB 54.8; LCB 42.0; ACB 24.2; LIO 8.9; CCA 241.6; LCA 175.4; ACA 60.3; CEV1 50.6; CEV2 35.0; CEV3 38.5; CEV4 40.0; CEV5 40.9; LEV1 63.9; LEV2 39.2; LEV3 39.4; LEV4 38.3; LEV5 48.8; CPMi 194.1; CPMa 211.6; LPL 139.1; LPAP 87.7; LPPP 53.5; LPGH1 20.2; LPGH2 13.4; LPGH3 48.1; LPFA 68.3; EIG 38.4; EIH 34.0; EIP 23.8; EIA 24.0; EIF 34.2; EAN 36.4; LPAP 123.6; LPPP 93.5.

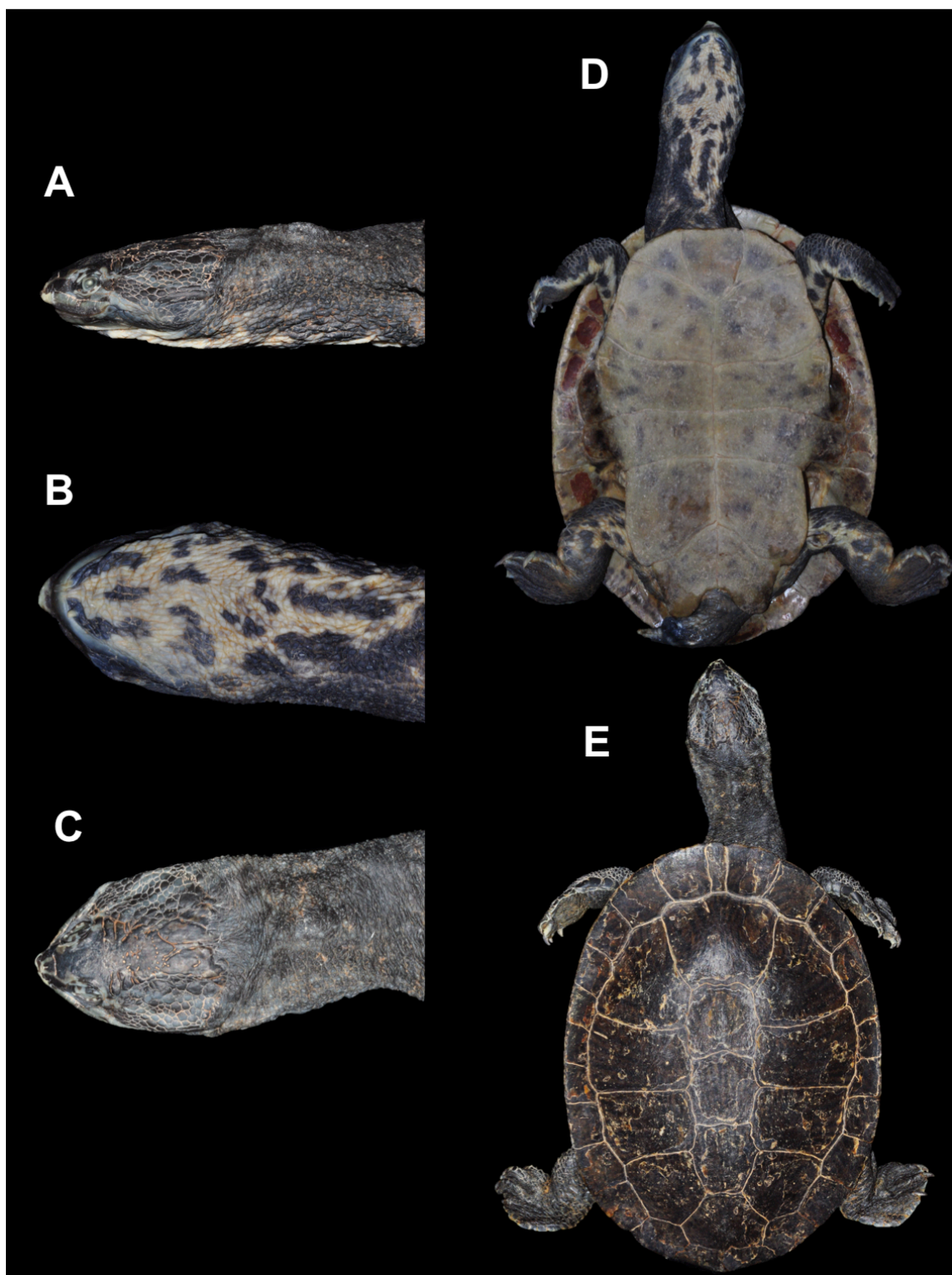


Figura 15. Neótipo de *Phrynops depressa* INPA-H 27809 (macho adulto).

Descrição da morfologia externa. Carapaça: A carapaça é alongada, convexa e pouco aplainada; A coloração é de marrom claro a marrom escuro com estrias pretas irregulares descontinuas ao longo de toda carapaça relativamente evidentes nos adultos; os pontos mais

anteriores da carapaça estão entre a 1–5 escamas marginais, enquanto que a região mais expandida da carapaça vai da 6–12 marginais. Nos adultos a quilha vertebral é segmentada e pouco evidente; **Plastrão:** A fórmula do plastrão utilizando a linha mediana é: gul > ana > hum > fem > peit > abd; plastrão levemente com manchas em forma de estrias ou pintas nos adultos e juvenis. A cor do plastrão é Amarela. O lobo posterior do plastrão é mais comprido que o anterior. O lobo anterior é marcadamente mais estreito que o posterior.

Tamanho e dimorfismo sexual. As fêmeas desta espécie pode chegar de em média (204.9 ± 27.5 mm), enquanto que os machos atingem até (202.6 ± 30.6 mm). Os maiores espécimes medidos neste estudo são uma fêmea de 224.0 mm e um macho de 247.0 mm.

Distribuição geográfica e história natural. *Phrynops depressa* ocorre na região Sudeste do Brasil, no estado de Minas Gerais e provavelmente nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. No município de Caratinga, estado de Minas Gerais (bioma Mata Atlântica), a espécie é facilmente encontrado nas margens do rio Manhuaçu, um dos principais afluentes da margem direita do rio Doce, numa região denominada Zona da Mata. A espécie, também é encontra nos pequenos córregos que drenam para o Manhuaçu e entre os afloramentos rochosos nas margens e no meio do rio.

Habitat. A espécie foi registrada em ambiente de Mata Atlântica, na RPPN – Miguel Feliciano Abdala, nas margens e corredeiras do rio Manhuaçu (Figura 16) (19.725810° S; 41.802147° W), afluente da margem direita do rio Doce



Figura 16. Habitat de *Phrynops depressa*, Rio Manhuaçu, RPPN – Miguel Feliciano Abdala, município de Caratinga, Minas Gerais.

Emys viridis (Spix, 1824)

Sinonímicos

Emys viridis Spix, 1824. Anim. Nova. Spec. Nov. Testud. Brasil.: 3; plate 2: fig. 3, palte 3: fig.

1. Localidade tipo: Rio Carinhanhae, tributário do Rio São Francisco, Brazil.

Chelys (Hydrapsis) viridis – Gray, 1831. In: Griffith & Piggeon, Anim. Kingd. Cuvier, 9, Synops. Spec. Class Rept.: 16.

Hydrapsis viridis – Gray, 1831. Synops. Rept., 1 (Cataphracta): 41.

Comentários sobre a espécie. Foi descrita como *Emys viridis* por Spix (1824). Em sua descrição Spix não menciona o número de espécimes que utilizou para descrevê-la, mais forneceu uma descrição muito detalhada e a ilustração da carapaça e do plastrão em sua obra. Segundo Fittkau (1983) as ilustrações são o espelho perfeito da carapaça e do plastrão e pode ser considerado o holótipo de *Emys viridis* (ZSM 3008/0) que está bastante preservada mais que

possui somente o esqueleto da carapaça. O comprimento da carapaça médio é de 228 mm e o máximo de 235 mm, o comprimento mínimo do plastrão é de 187 mm e máximo de 201 mm. De acordo com a descrição original e Vanzolini (1981) a espécie foi coletada por Spix e Martius na expedição ao Brasil entre 1817-1820.

Holótipo (Figura 17). Zoologische Staatssammlung München, ZSM 3008/0 (adulto), localidade tipo rio Carinhanhae = rio Carinhanha (14° 18'S; 43° 47'W), tributário do rio São Francisco, Brasil.

Descrição do holótipo. Veja em Spix, 1824. Animalia Nova, Species Novae, Testudinum et Ranarum, pg. 5, pl. II fig. 3 e pl. III fig. 1.

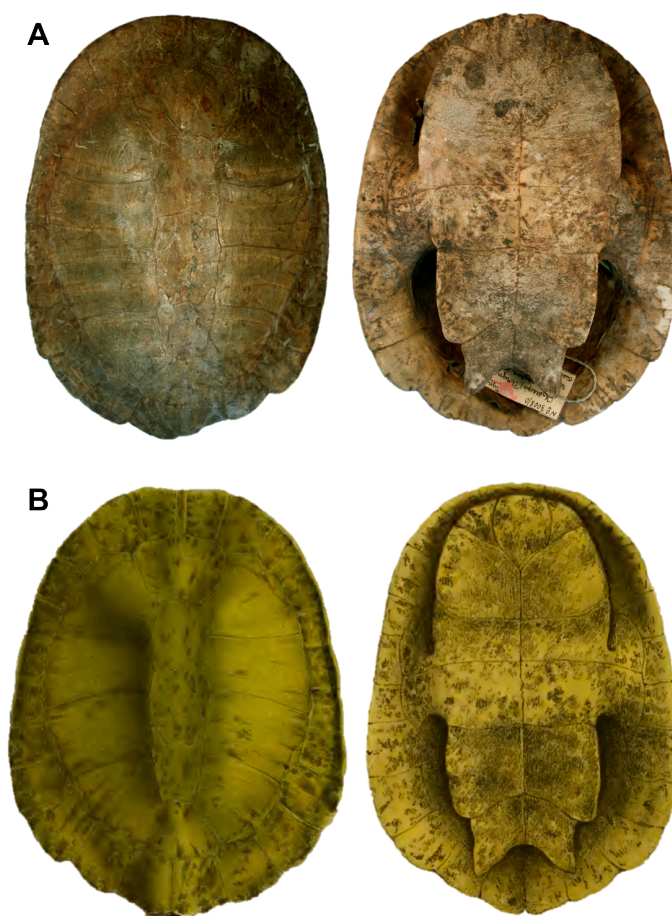


Figura 17. Holótipo de *Phrynops viridis* ZSM 3008/0. A) fotografia da carapaça e do plastrão do holótipo; B) prancha publicada em Spix (1824).

Material examinado. INPA-H 27999, 27988, 27997, 27993, 27991, 27992, 28000, 27995, 27989, 27994, 28001, 27996, 27987, 30532, 30533, 30531, 34887, 34884, 34886, 27799, 27798, 27796, 27802, 27803 (fêmeas), INPA-H 27998, 27990, 30529, 30534, 30530, 34879, 34888, 34881, 34882, 34883, 34885, 34880, 27792, 27797, 27794, 27795, 27793, 27800, 27801 (machos).

Nova diagnose. *Phrynops viridis* (Figura 18) é diagnosticado pela combinação dos seguintes caracteres: 1) região dorsal da cabeça é esverdeada com duas estrias pretas paralelas irregulares bem marcantes que iniciam acima dos olhos e adentram a região do peçoço; 2) região ventral da cabeça com estrias pretas irregulares muito marcantes, arredondadas ou em forma de estrias delgadas relativamente abundantes; 3) vista lateral da cabeça possui duas linhas laterais pretas delgadas, uniformes, intercaladas por uma linha branca não muito marcante, a primeira linha preta inicia na ponta do focinho, após a narina, passando pelo olho e tímpano e se estende até o final do pescoço, a linha branca menos evidente inicia após a mandíbula e vai até o final do pescoço, e a segunda linha preta inicia na região gular (queixo) e se estende até o final do pescoço; 4) o comprimento da cabeça é 22.5% do comprimento total da carapaça (CCA) para as fêmeas e de 21.2% para os machos; 5) a carapaça é arredondada, pouco aplainada; 6) a coloração da carapaça é marrom claro a marrom escuro com estrias pretas irregulares descontinuas pouco evidentes; 7) o plastrão é bastante manchado por pintas ou estrias irregulares; a coloração do plastrão é vermelho-alaranjado; 8) quilha vertebral bastante evidente, segmentada, iniciando a partir da primeira escama vertebral; 9) a escama gular é mais larga do que longa; 10) a cauda possui duas listras pretas bem marcantes que vai da coxa até a ponta da cauda; 11) os membros anteriores e posteriores com pequenas manchas pretas arredondadas; 12) a região dorsal do pescoço é bastante rugosa, com tubérculos pretos grandes; 13) em vida os machos adultos possuem tubérculos do pescoço de coloração laranja; o plastrão de coloração laranja-avermelhado vibrante.

Medidas morfométricas (mm). Média dos espécimes **fêmeas**: CCB 55.3, LCB 45.4, ACB 26.5, LIO 8.6, CCA 244.8, LCA 180.3, ACA 70.8, CEV1 46.6, CEV2 39.7, CEV3 41.5, CEV4 39.4, CEV5 43.4, LEV1 61.9, LEV2 41.8, LEV3 39.9, LEV4 37.0, LEV5 53.0, CPMi 201.2, CPMa 221.6, LPL 144.7, LPAP 79.1, LPPP 52.4, LPGH1 22.7, LPGH2 16.2, LPGH3 46.9, LPFA 63.0, EIG 41.0, EIH 27.6, EIP 27.7, EIA 32.0, EIF 40.8, EIAN 33.8, LPA 114.0, LPP 92.2;

machos: CCB 44.7; LCB 37.8; ACB 22.0; LIO 7.57; CCA 210.0; LCA 154.2; ACA 59.5; CEV1 40.0; CEV2 34.5; CEV3 35.9; CEV4 31.9; CEV5 37.0; LEV1 55.3; LEV2 38.2; LEV3 37.3; LEV4 35.3; LEV5 44.8; CPMi 170.9; CPMa 189.7; LPL 120.7; LPAP 66.5; LPPP 46.5; LPGH1 19.4; LPGH2 14.3; LPGH3 39.9; LPFA 53.3; EIG 35.9; EIH 23.0; EIP 22.6; EIAB 27.1; EIF 35.0; EAN 27.7; LPAP 96.0; LPPP 76.5.



Figura 18. Espécime de *Phrynops viridis*, fêmea adulta, coletado no Rio Carinhanha, município de Carinhanha (Localidade-tipo), estado da Bahia. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.

Descrição da morfologia externa. Carapaça: A carapaça é arredondada pouco aplainada com listras pretas irregulares em alguns espécimes, em outros ausência total de estrias. A coloração da carapaça é marrom clara a marrom escuro; os pontos mais anteriores da carapaça estão entre a 1–5 escamas marginais, enquanto que a região mais expandida da carapaça vai da 6–12 marginais. Nos adultos e juvenis a quilha vertebral é bastante evidente, iniciando a partir da primeira escama vertebral; **Plastrão:** A fórmula do plastrão utilizando a linha mediana é: gul > fem > ana > abd > hum > peit. Predominantemente com muitas manchas em forma de pintas ou estrias nos adultos e juvenis. A cor do plastrão é laranja-avermelhado. O lobo posterior do plastrão é mais comprido que o anterior. O lobo anterior é marcadamente mais estreito que o posterior.

Tamanho e dimorfismo sexual. As fêmeas desta espécie podem chegar de atingir em média (244.8 ± 64.3 mm), enquanto que os machos atingem até (210.0 ± 43.6 mm). Os maiores espécimes medidos neste estudo são uma fêmea de 350.0 mm e um macho de 276.7 mm.

Distribuição geográfica e história natural. *Phrynops viridis* ocorre na região Nordeste do Brasil, nos estados o Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Bahia, Distrito Federal e provavelmente nos estados do Piauí, Paraíba, Sergipe e Alagoas. No município de Caicó (Caatinga), estado do Rio Grande do Norte, a espécie é facilmente vista no Lago Itans e nos tanques de piscicultura do Denocs – Departamento Nacional de Obras Contra a Seca; no município de Juazeiro do Norte (Caatinga), estado do Ceará, a espécie é encontrada no rio Palmeiras, localizado na região metropolitana de Juazeiro e nos pequenos córregos antropizados da cidade; no município de Tamandaré (Mata Atlântica), estado do Pernambuco, a espécie é encontrada na Reserva Biológica Saltinho e no rio Paquevira; no município de Carinhanha (Caatinga), estado da Bahia, localidade tipo da espécie, é facilmente encontrada nas margens dos rios Carinhanha e São Francisco; em Brasília, Distrito Federal, a espécie é encontrada em abundância nas margens do Lago Paranoá, principalmente na marina do Tennis Clube Brasília.

Habitat. A espécie foi registrada em ambiente de transição entre os biomas Cerrado e Caatinga, na divisa entre os estados da Bahia e Minas Gerais, nas margens do rio Carinhanha, (Figura 19) (14.319964° S; 43.847613° W), afluente da margem esquerda do rio São Francisco.



Figura 19. Habitat de *Phrynops viridis*, rio Carinhanha (Localidade-tipo), município de Carinhanha, Bahia.

Platemys waglerii (Duméril & Bibron, 1835)

Sinônimos.

Platemys waglerii Duméril e Bibron, 1835. Erpétol. gén., Hist. Natur. Rept., 2: 242, localidade tipo: Brasil.

Hydrapsis waglerii Gray, 1844. (ex errore), Cat. Tort. Crocod. Amphib. Coll. Brit. Mus.: 41.

Platemys waglerii Boulenger, 1889. Cat. Chelon. Rhynchoceph. Croco. Brit. Mus. (Natur. Hist.): 225.

Phrynops waglerii – Stejneger, 1909. Proc. Biol. Soc. Washington, 22: 127.

Comentários sobre a espécie. Foi descrita como *Platemys waglerii* por Duméril & Bibron, 1835. Esta espécie foi dedicada a Johann Georg Wagler (1800-1832), zoólogo alemão e taxonomista que durante sua vida trabalhou principalmente com répteis e aves. Em sua obra Duméril e Bibron forneceram uma descrição bastante detalhada da espécie. O holótipo está empalhado no Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, MNHN 8758, o espécime tipo aparenta ser de uma (fêmea adulta), o membro anterior esquerdo e posterior direito não existem mais (Bour, 2008). De acordo com Bour (2008) a identidade de *Platemys waglerii* (= *Phrynops waglerii*) permanece enigmática. Após a descrição original foi considerada uma espécie válida, mais sem dados adicionais até que novos espécimes foram coletados em Piracicaba, estado de São Paulo por Hermann von Ihering em 1898 que mencionou que o espécime trata-se de uma *Platemys waglerii*.

Holótipo (Figura 20). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, MNHN 8758 (aparentemente uma fêmea adulta), localidade tipo “Brasília”, referindo-se ao Brasil.

Descrição do holótipo. Este *Platemys* é de todos os seus congeneres aquele cuja caixa de ossos (carapaça) é mais alongada. A carapaça é oval e as duas extremidades são estreitas, a anterior é arredondada ou truncada e a posterior subobtusa. O disco da carapaça é ligeiramente compactado nos dois últimos pares de placas (escamas) costais. A escama nugal é quadrilateral e é mais longa do que larga. Todas as escamas que cobrem a carapaça são lisas. A primeira placa vertebral tem oito lados, cinco dos quais tocam a nuca. O plastrão é arredondado e mais largo na região anterior do que posterior.



Figura 20. Holótipo de *Phrynops waglerii* MNHN 8758. A) vista lateral da cabeça; B) vista ventral da cabeça; C) vista dorsal da cabeça; D) carapaça; E) Plastrão. Fotos: Roger Bour.

Nova diagnose. *Phrynops waglerii* (Figura 21) é diagnosticado pela combinação dos seguintes caracteres: 1) região dorsal da cabeça é preta com várias estrias acizentada a esbranquiçada bem marcantes que iniciam entre a região orbital (entre olhos) e vai até o final da caixa craniana; 2) a região ventral da cabeça com pouquíssimas listras, estrias ou pintas pretas irregulares; 3) vista lateral da cabeça possui duas linhas laterais pretas, intercaladas por uma linha branca muito marcante, a primeira linha preta inicia na ponta do focinho após a narina, passando pelo olho e tímpano e se estende até o final do pescoço, a linha branca bem evidente inicia após a narina e vai até o final do pecoço, e a segunda linha preta inicia na ponta do focinho e se estende até o 2/3 do pescoço; 4) o comprimento da cabeça é 19.4% do comprimento total da carapaça (CCA) para as fêmeas e de 19.5% para os machos; 5) a carapaça é oval, bastante aplainada; 6) de coloração marrom escuro e ausência de listras ou estrias; 7) o plastrão é relativamente manchado por pintas ou estrias irregulares de coloração preta e a coloração do plastrão é amarelo-alaranjado; 8) quilha vertebral pouco evidente, segmentada, iniciando a partir da primeira escama vertebral; 9) a escama gular é mais longa do que larga; 10) a cauda possui duas listras pretas bem que vai da coxa até a ponta posterior da cloaca; 11) os membros anteriores e posteriores com pouquíssimas manchas pretas arredondadas; 12) a região dorsal do pescoço é bastante rugosa, com tubérculos pretos grande arredondados; 13) em vida os machos adultos possuem tubérculo do pescoço de coloração acizentada ou esbranquiçada bastante abundantes; o plastão de coloração amarelo-alaranjado.

Medidas morfométricas (mm). Média dos espécimes **fêmeas**: CCB 52.0; LCB 43.7; ACB 26.0; LIO 9.8; CCA 266.9; LCA 199.1; ACA 73.5; CEV1 51.7; CEV2 45.2; CEV3 45.4; CEV4 40.8; CEV5 47.9; LEV1 71.3; LEV2 49.6; LEV3 48.3; LEV4 45.0; LEV5 56.7; CPMi 216.5 CPMa 241.4; LPL 169.9; LPAP 89.4; LPPP 60.0; LPGH1 27.7; LPGH2 20.3; LPGH3 50.0; LPFA 71.1; EIG 45.1; EIH 29.3; EIP 30.4; EIAB 36.3; EIF 48.8; EAN 35.8; LPAP 126.6; LPPP 104.1; **machos**: CCB 49.9; LCB 39.6; ACB 24.2; LIO 9.31; CCA 255.4; LCA 187.6; ACA 67.9; CEV1 44.6; CEV2 42.5; CEV3 42.9; CEV4 40.4; CEV5 46.1; LEV1 65.1; LEV2 46.4; LEV3 45.6;

LEV4 41.6; LEV5 56.6; CPMi 210.0; CPMa 225.8; LPL 150.2; LPAP 80.9; LPPP 55.7; LPGH1 24.4; LPGH2 17.7; LPGH3 47.71; LPFA 67.1; EIG 42.1; EIH 26.5; EIP 28.0; EIAB 34.9; EIF 46.5; EAN 33.1; LPAP 116.8; LPPP 97.8.



Figura 21. Espécime de *Phrynops waglerii*, fêmea adulta, coletado no Rio Piracicaba, município de Piracicaba, estado de São Paulo. Em sentido horário, aspectos geral, detalhe da cabeça, plastrão e carapaça respectivamente.

Descrição da morfologia externa. Carapaça: A carapaça é oval, bastante aplainada, de coloração marrom escuro e ausência de listras ou estrias, tanto nos adultos quanto nos juvenis. A coloração da carapaça é marrom escuro, quase preto; os pontos mais anteriores da carapaça estão entre a 1–5 escamas marginais, enquanto que a região mais expandida da carapaça vai da 6–12 marginais. Nos adultos e juvenis a quilha vertebral não é muito evidente, iniciando a partir da primeira escama vertebral; **Plastrão:** A fórmula do plastrão utilizando a linha mediana é: fem

> gul > abd > ana > peit > hum. Predominantemente com poucas manchas em forma de pintas ou estrias nos adultos e juvenis. A cor do plastrão é amarelo-laranjado, nos juvenis é avermelhado. O lobo posterior do plastrão é mais comprido que o anterior e o lobo anterior é mais estreito que o posterior pouca coisa.

Tamanho e dimorfismo sexual. As fêmeas desta espécie podem chegar de atingir em média (266.9 ± 49.9 mm), enquanto que os machos atingem até (255.4 ± 46.2 mm). Os maiores espécimes medidos neste estudo são uma fêmea de 350.3 mm e um macho de 309.7 mm.

Distribuição geográfica e história natural. *Phrynops waglerii* ocorre nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul do Brasil, nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e ainda em Corrientes na Argentina. No município de Porto Estrela (Cerrado), estado do do Mato Grosso, a espécie é facilmente encontrada em pequenos córregos com mata ciliar; em Brasília, no Distrito Federal a espécie é muito abundante nas margens do Lago Paranoá, principalmente na marina do Tennis Clube Brasília; no município de Campo Grande (Cerrado), estado de Mato Grosso do Sul, a espécie é muito abundante no córrego (sem cobertura vegetal) canalizado e antropizado, Anhanduinzinho, localizado na região metropolitana de Campo Grande; no município de Castilho, estado de São Paulo, a espécie é bastante abundante nas margens do rio Aguapeí, afluente da margem direita do rio Paraná; no município de Piracicaba, estado de São Paulo, a espécie é bastante frequente em algum trechos do rio Piracicaba e em alguns de seus afluentes; no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais, a espécie é muito abundante no rio Uberabinha, localizado na região metropolitana de Uberlândia; no município de Londrina, estado do Paraná, a espécie é abundante no Ribeirão Lindóia, com mata ciliar em ambas as margens e na Província de Corrientes na Argentina a espécie foi coletada nas margens da UHE Yacyretá, rio Paraná.

Habitat. A espécie foi registrada em ambiente de Mata Atlântica, nas margens do rio Piracicaba, (Figura 22) (22.679111° S; 47.540663° W), afluente da margem direita do rio Tietê.



Figura 22. Habitat de *Phrynops waglerii*, Rio Piracicaba, município de Piracicaba, São Paulo.

Discussão

As populações consideradas como *Phrynops geoffroanus* observadas no presente estudo representam clados de linhagens agregadas que são alopátricas. Embora as evidências de divergências morfométricas, morfológicas e genéticas sejam consistente com o isolamento reprodutivo, nos casos de alopatria é necessário que haja um julgamento do status das espécies com base no grau de diferenciação entre elas (Georges & Thomson, 2010).

Os resultados de nossas análises mostram uma separação entre *P. geoffroanus* e as espécies que atualmente são consideradas sinônimos deste táxon. Ficou evidenciado neste estudo que as populações agregadas relacionadas aos distintos biomas e bacias hidrográficas brasileira são profundamente distintos de *P. geoffroanus*. Sendo assim, decidimos dividir o complexo de espécies de *P. geoffroanus* revalidando as espécies *P. depressa*, *P. viridis* e *P. waglerii*.

A linhagem do Nordeste/Centro-oeste (*Phrynops viridis*) difere em 1,7%, a linhagem do Sudeste/Caratinga (*Phrynops depressa*) difere em 1,4% e a linhagem Centro-oeste/Sudeste/Sul/Argentina (*Phrynops waglerii*) difere em 1,0% respectivamente de *P. geoffroanus* por meio da codificação de nucleotídeos mitocondriais Citocromo oxidase I – (COI). Quando comparadas as distâncias genéticas entre *P. depressa*, *P. viridis* e *P. waglerii* elas foram maiores >2% entre si.

De acordo com o estudo de Reid *et al.* (2011) o código de barras baseado em distância genética usa um corte de 2% de divergência para vertebrados para determinar a identidade das espécies, implicando que os indivíduos devem ser <2% divergentes de membros de sua própria espécie e >2% divergentes de membros de outras espécies. Os níveis baixos de divergência intraespecífica encontrados entre as espécies *P. depressa*, *P. viridis* e *P. waglerii* comparado com *P. geoffroanus* podem ter sido causados por radiações evolutivas recentes associados as baixas taxas de evolução do mtDNA que já foram previamente observados em tartarugas (Reid *et al.* 2011).

Na busca de diferenças alélicas para delimitação de espécies, a utilização do polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs) (Seeb *et al.* 2011) tem sido eficaz e promissor para rastrear diferenças alélicas fixas em espécies amplamente distribuídas (Martinez *et al.* 2016), mas esta técnica multilocus tem sido pouco utilizada em quelônios (e.g Fritz *et al.* 2005, 2007).

O complemento de dados genéticos são congruentes com as análises morfométricas, morfológicas, que mostram as espécies *P. depressa*, *P. viridis* e *Phrynops waglerii* são separadas por distância generalizada, estes resultados corroboram com o estudo de Carvalho *et al.* (2016), que encontraram 1380 SNP's privativos nas populações que atualmente eram consideradas como *P. geoffroanus*.

Phrynops tuberosus faz parte do complexo de espécies *P. geoffroanus* foi incluída por Rhodin e Mittermeier (1983), mais alguns autores tem considerado esta espécie uma subespécie de *P. geoffroanus* (e.g Wermuth & Mertens, 1961). No presente estudo ficou evidenciado que

este táxon não é uma subespécie de *P. geoffroanus* e sim uma espécie válida nas análises do mtDNA. No entanto, *P. hylarii* se posicionou dentro das populações agregadas de *P. waglerii* e *P. geoffroanus*. Diante desses resultados se faz necessário ampliar o número de amostras deste táxon para tentar elucidar seu status taxonômico. E finalmente, resultados genéticos mostraram que *Phrynops williamsi* é a espécie mais basal deste gênero.

Com a revalidação das três espécies *P. depressa*, *P. viridis* e *Phrynops waglerii*, o número de espécies do gênero *Phrynops* passou de quatro para sete. No entanto, a riqueza de espécies dentro deste gênero ainda parece subestimada, dada a existência de uma espécie não descrita que foi revelada neste estudo proveniente do norte do Brasil (Carvalho *et al.* em prep.), o que demonstra que a família Chelidae vem sendo subestimada ao longo de décadas.

Conservação.

Por meio dos resultados apresentados nesta revisão taxonômica, o status de conservação das espécies contidas no gênero *Phrynops* necessitam de uma reavaliação, uma vez que o status de todas as espécies encontram-se atualmente inadequados, devido a falta de conhecimento sobre a real distribuição geográfica de cada um dos táxons. Esperamos que em futuras avaliações dos quelônios continentais brasileiros possam resultar em novas categorias de conservação, uma vez que estas espécies podem estar inseridas em categorias inferiores a sua realidade.

Literatura Citada

Bour, R. and Zaher, H. 2005. A new species of *Mesoclemmys*, from the open formations of northeastern Brazil (Chelonii, Chelidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*. 24: 295–311.

Bour, R. 2008a. Types of three species of sideneck turtle belonging to the genus *Phrynops* Wagler, 1830: *Emys geoffroana* Schweigger, 1812, *Platemys hylarii* Duméril & Bibron, 1835 and *Platemys waglerii* Duméril & Bibron, 1835. *Emys* 2: 35–41.

Bour, R. 2008b. The Life and Herpetological Contributions of August Frederick Schweigger (1783-1821). An Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Facsimile Reprint in Herpetology Issued in Commemoration of the 6th World Congresso f Herpetology, Manaus, Brazil, 17-22 August 2008. Villanova, Pennsylvania, USA. 379pp.

Carvalho, V.T., Martínez, J.G., Hernández-Rangel, S.M., Astolfi-Filho, S., Vogt, R.C, Farias, I.P. and Herbek, T. 2016. Giving IDs to turtles: SNP Markers for assingment of individulas to lineages of the geographically structured *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). Conservation Genetic Resources 1–7.

Ceríaco, L.M. and Bour, R. 2012. Schweigger’s (1812) chelonian types from the extinct eightennth century Portuguese “Royal cabinet of natural history of Ajuda”: some contributions for their identification and nomenclatural implications. Zootaxa 3395: 18–32.

Cope, E.D. 1864. On the limits and ralations of the Rniformes. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 16: 181-183.

Cunha, O.R. 1991. O Naturalista Alexandre Rodrigues Ferreira. Uma análise comparativa de sua Viagem Filosófica (!783-1793) pela Amazônia e Mato Grosso com a de outros naturalistas posteriores. SCT/CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi. 88pp.

Cuvier, G.L.C.F.D. 1829. Le Règne Animal Distribuié d’après son Organisation pour Servir de Base à l’Histoire Naturalledes Animaux et d’Introduction à l’Anatomie Comparée. Nouvelle Édition, Revue et Augmentée [Edition 2]. Tome II. Paris: Deterville, 406 pp.

Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society 85: 407–415.

Duméril, A.M.C and Bibron, G. 1835. Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris. Vol. 2, 680pp.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.

Evolution 4: 783–791.

Fitzinger, L.J.F.J. 1826. Neue Classification der Reptilien nach ihrem natürlichen Verwandtschaften nebst einer Verwandtschafts-Tafel und einem Verzeichnisse Museum zu Wien. J.G. Hübner, Wien. Vii + 66p.

Fitzinger, L.J. 1835. Entwurf einer systematischen Anordnung der Schildkröten nach den Grundsätzen der natürlichen Methode. Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte 1:105–128.

Friol, N.R. 2014. Filogenia e Evolução das espécies do gênero *Phrynops* (Testudines: Chelidae). Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia, 70 pp.

Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Triprpi, S., Pennisi, M.G., Lenk, P., Joger, U. and Wink, M. 2005. A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). Zoologica Scripta 34: 351–371.

Fritz, U., Hundsdoerfer, A.K., Šíroký, P., Auer, M., Kmi, H., Lehmann, L., Mazanaeva, L.F., Turkozan, O. and Wink, M. 2007. Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). Amphibia-Reptilia 28: 97–121.

Fritz, U., Šíroký, P., Kmi, H., Wink, M. 2005. Environmentally caused dwarfism or a valid species – Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. Molecular Phylogenetics and Evolution 37: 389–401.

Fouquet, A., Cassini, C.S., Haddad, C.F.B., Pech, N., and Rodrigues, M.T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog

genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855–870.

Fujita, M.K., Engstrom, Tag N., Starkey, D.E., and Shaffer, B. 2004. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intro. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1031–1040.

Gehara, M., Crawford, A.J., Orrico, V.G.D., Rodriguez, R., Löteters, S., Fouquet, A., Barrientos, L.S., Brusquetti, F., De la Riva, I., Ernst, R., Urrutia, G.G., Glaw, F., Guayasamin, J.M., Hölting, M., Jansen, M., Kok, P.J.R., Kwet, A., Lingnau, R., Lyra, M., Moravec, J., Pombal Jr, J.P Rojas–Runjac, F.J.M., Schulze, A., Señaris, J.C., Solé, M., Rodrigues, M.T., Twomey, E., Haddad, C.F.B., Vences, M., and Köhler, J. 2014. High Levels of Diversity Unconverged in a Widespread Nominal Taxon: Continental Phylogeography of the Neotropical Tree Frog *Dendropsophus minutus*. *Plos One* 9: 1–12.

Georges, A., Birrel, J., Saint, K.M., Mccord, W., and Donnellan, S. C. 1998. A phylogeny for side-necked turtles (Chelonia: Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. *Biological Journal of Linnean Society* 67: 213–246.

Georges, A., and Thomson, S. 2010. Diversity of Australasian freshwater turtles, with an annotated synonym and keys to species. *Zootaxa* 2496: 1–37.

Gray, J.E. 1825. A synopsis of the genera of reptiles and amphibian, with a description of some new species. *Annals of Philosophy* 10:193-217.

Gray, J.E. 1831. A Synopsis of the Species of the Class Reptilia. 110 pp. Appendix to E. Griffith and E. Pidgeon, The Class Reptilia, Arranged by the Baron C. Cuvier, with Specific Descriptions. Vol. 9. 481 p. *In*: The Animal Kingdom Arraged in Conformity with its Organization by the Baron Cuvier, with Additional Descriptions of All Species Hitherto Named, and of Many Others. 16 vols. Whittaker, Treacher and Co., London.

Gray, J.E. 1873. Observations on chelonians, with descriptions of new genera and species. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, London 11: 289–308.

Guarnizo, C.E., Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Santos, M.G., Fenker, J., Sousa, L., D'Angiollela, Santos, A.R., Strüssmann, C., Rodrigues, M.T., Gamble, T., and Colli, G.R. 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidea) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 279–289.

Guicking, D., Jorge, U., and Wink, M. 2009. Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR–PCR fingerprinting. *Organism Diversity & Evolution* 9: 201–214.

Guidon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.

Guidon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate MaximumLikelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Sytematic Biology* 3: 307–321.

Guillon, J.M., Guéry, L., Hulin, V., and Girondot, M. 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology* 81: 147–158.

Huebinger, R.M., Bickham, J.W., Rhodin, A.G.J., and Mittermeier, R.A. 2013. Mitochondrial DNA Corroborates Taxonomy of the South American Chelid Turtles of the Genera *Platemys* and *Acanthochelys*. *Chelonian Conservation and Biology* 12: 168–171.

Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.

Iverson, J.B. 1992. A Revised Checklis with Distribution Maps of the Turtles of the World. Richmond, In: Privately printed, 363 pp.

Iverson, J.B., Le, M., and Ingram, C. 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 929–939.

Jombart, T. 2008. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.

Jombart, T., Devillard, S. and Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., and Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.

Krenz, J.G., Naylor, G.J.P., Shaffer, H.B., and Janzen, F.J. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 178–191.

Legler, J.M. 1960. A simple and inexpensive device for trapping aquatic turtles. *Proceedings of the Utah Academy of Science* 37: 257–312.

Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per Regna tria Naturae secundum Classes, Ordenis, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Ed. 10. Salvii, Stockholm 1: 1–824.

Lourenço, J.M., Claude, J., Galtier, N., and Chiari, Y. 2012. Dating cryptodiran nodes: Origin and diversification of the turtle superfamily Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 496–507.

Martínez, J.G., Caballero-Gitán, S.J., Sánchez-Bernal, D., Assunção, E.N., Astolfo-Filho, S., Hrbek, T., and Farias, I.P. 2016. De novo SNP Markers development for the Neotropical gilded

catfish *Brachyplatystoma rousseauxii* using next-generation sequencing-based genotyping. Conservation Genetic Resources 1–4.

Merrem, B. 1820. Versuch eines Systems der Amphibien Tentamen Systematis Amphiborum. Krieger, Marburg 191pp.

McCord, W.P., Joseph–Ouni, M. and Lamar, W.W. 2001. A Taxonomic Reevaluation of *Phrynops* (Testudines: Chelidae) with the description of two new genera and new species of *Batrachemys*. Revista de Biología Tropical 49: 715–764.

McCord, W.P. and Thomson, S.A. 2002. A new species *Chelodina* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from Northern Australia. Journal of Herpetology 2: 255–267.

McCord, W.P. and Joseph–Ouni, M. 2007. A New Species of *Chelodina* (Testudines: Chelidae) from sothwestern New Guinea (Papua, Indonesia). Reptilia 52: 47–52.

Restrepo, A. and Páez, V.P. 2012. V. Biología y Conservación de las tortugas continentals de Colombia. (eds) Páez, V. P.; Morales–Betancourt, M. A.; Lasso, C. A.; Castaño–Mora. O.; Bock, B. C. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia, pp. 266–268.

Oliveira, D.P., Carvalho, V.T., and Herbek, T. 2016. Cryptic diversity in lizard genus *Plica* (Squamata): phylogenetic diversity and Amazonian biogeography. Zoologica Scripta.

Pääbo, S. 1990. Amplifying ancient DNA. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego pp. 159–166.

Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., and Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. Frontiers in Zoology 7: 1–16.

Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. e Mable, B.K. (Eds) Molecular Systematics. Sinauer e Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 205–247.

Petchey O.L, Gaston K.J. 2007 Dendrograms and measuring functional diversity. *Oikos* 116: 1422–1426.

Peters, W.K.H. 1870. Über *Platemys tuberosa*, eine neue Art von Schidkröten aus British-Guiana Monatsber. Akad. Wiss. Berlin 311-313.

Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biological and Evolution* 25: 1253–1256.

Pough, F.H., Heiser, J.B., and Janis, C.M. 2008. A vida dos vertebrados. Atheneu Editora São Paulo, 4a Edição., 695 pp.

R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rambaut, A. and Drummond, A.J. 2007. Tracer Version 1.5. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

Reid, B.N., Le, M., McCord, W.P., Iverson, J.B., Georges, A., Bergmann, T., Amato, G., Desalle, R., and Naro-Maciel, E. 2011. Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. *Molecular Ecology Resources* 11: 956–967.

Rhodin, A.G.J. and Mittermeier, R.A. 1983. Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P. geoffroanus* complex. In: RHODIN, ANDERS G.J. and MIYATA, KENNETH. (Editors). *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology. Essays in Honor of Ernest E. Williams*. Cambridge, Massachusetts: Museum of Comparative Zoology 58–73.

Rojas, R.R., Carvalho, V.T., Gordo, M., Ávila, R.W., Farias, I.P., and Hrbek, T. 2014. A new species of *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae) from the southwestern party of the Brazilian Guiana Shield. *Zootaxa* 3753: 079-095.

Rueda-Almonacid, J.V., Carr, J.L., Mittermeier, R.A., Rodríguez-Machecha, J.V., Mast, R.B., Vogt, R.C., Rhodin, A.G.J., Ossa-Velásquez, J., Rueda, J.N and Mittermeier, C. G. 2007. Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del 16 Trópico. Serie de Guías Tropicales de Campo N 6. Conservation International. Editorial Panamericana, Formas e Impressos. Bogotá, Colômbia, 538 pp.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY, 1626 pp.

Schneider, L., Ferrara, C., and Vogt, R.C., 2011. Nesting Ecology and Nest Predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in the Guapore River of the Brazilian and Bolivian Amazon. *Chelonian Conservation and Biology* 10: 206–212.

Schweigger, A.F. 1812. *Prodromus monographiae Cheloniorum*. Koenigsberg. *Arch. Naturw. Math* 1:271–368, pp. 406–458.

Seddon, J.M., Georges, A., Baverstock, P.R., and Mccord, W. P. 1997. Phylogenetic Relationships of Chelid Turtles (Pleurodira: Chelidae) Based on Mitochondrial 12S rRNA Gene Sequence Variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 55–61.

Seeb, J.E., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S. And See, L.E. 2011. Single-nucleotide polymorphism (SNP) Discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources* 11:1–8.

Shaffer, H.B., Meylan, P., and Mcknight, M.L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology* 46: 235–268.

Shaffer, B.H., and Thomson, R. 2007. Delimiting Species in Recent Radiations. *Systematic Biology* 6: 896–906.

Shamblin, B.M., Dutton, P.H., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Naro-Maciel, E., Santos, A.J.B., Bellini, C.B., Marcovaldi, M.A., and Nairn, C.J. 2015. Deeper Mitochondrial Sequencing Reveals Cryptic Diversity and Structure in Brazilian Green Turtle Rookeries. *Chelonian Conservation and Biology* 14:167–172.

Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Muge, G., and Shaffer, H. B. 2014. Multilocus phylogeny of the New–World mud turtles (Kinosternidae) supports the traditional classification of the group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76: 254–260.

Spix, J.B von. 1824. *Animalia nova; sive, Species novae Testudinum et Ranarum, quas in itinere per Brasiliam annis 1817-20 collegit et descripsit.* F.S. Hübschmann, München. Iv.

Strauch, A. 1862. *Chelonogische Studien, mit besonderer Beziehung auf die Schildkrötensammlung der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften zu St.-Petersburg.* *Mém. Acad. Impér. Sci. St.-Pétersbourg* 7: 1–196.

Taberlet, P., Meyer, A., and Bouvet, J. 1992. Unusual mitochondrial DNA polymorphism in two local populations of blue tit (*Parus caeruleus*). *Molecular Ecology* 1: 27–36

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11:4673–4680.

Thomson, S., Georges, A. and Limpus, C.L. 2006. A new species of freshwater turtle in the genus *Elseya* (Testudines: Chelidae) from central coastal Queensland, Australia. *Chelonian Conservation Biology* 5: 74-86.

Thomson, S. and Georges, A. 2009. *Myuchelys* gen. nov. – a new genus for *Elseya latisternum* and related forms of Australian freshwater turtle (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *Zootaxa* 2053: 32–42.

Thomson, S., Amepou, Y., Anamiato, J., and Georges, A. 2015. A new species and subgenus of *Elseya* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from New Guinea. *Zootaxa* 4006: 59–82.

Thomson, S. and Georges, A. 2016. A new species of freshwater turtle of the genus *Elseya* (Testudinata: Pleurodira: Chelidae) from the Northern Territory of Australia. *Zootaxa* 4061: 018–028.

Uetz, P., Freed, P. and Hosek, J. (eds). 2016. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org> accessed 10/10/16.

Van Dijk, P.P., Iverson, J.B., Rhodin, A.G.J., Shaffer, H.B., and Bour, R. 2014. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution, with Maps and Conservation Status. In: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Bulhmann, K.A., Iverson, J.B., and Mittermeier, R.A. (Eds). *Conservation Biology of Freshwater Turtle and Tortoise: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. *Chelonian Research Monographs* 5: 329–479.

Vogt, R.C. 1980. New methods for trapping aquatic turtles. *Copeia*: 1980:368–371.

Vogt, R.C. 2008. Amazon Turtles. Ed. Lima. Vol 1, pp. 66–69.

Wagler, J. 1830. Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vögel. Stuttgart und Tübingen, München: J. G. Cotta. vi + 354 pp., 9 pls.

Wagler, J. 1833. Descriptiones et Icones Amphibiorum. Stuttgart and Tübingen, Monaco: J.G. Cotta. III. Pl. XX-XXXVI.

Wermuth, H. and Mertens, R. 1961. Schildkroten, Krokodile, Bruckenechsen. Jena, Gustav Fischer, 422 pp.

Wermuth, H. and Mertens, R. 1977. Liste der rezentem Amphibien und Reptilien. Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia. Das Tierreich 100: 1–174.

Appendix 1. Specimens examined.

Phrynops waglerii – Group A (n = 90) – BRAZIL: **SÃO PAULO**: Piracicaba, Rio Piracicaba (INPA-H 26122-26135); Castilho, Reserva Particular do Patrimônio Natural Foz do rio Aguapeí (INPA-H 34348, 34349; 34253-34256; 34291-34294; 34296); Anhembi, Rio Piracicaba (INPA-H 34302-34303); **MINAS GERAIS**: Uberlândia, Rio Uberabinha (INPA-H 27591-27605); **PARANÁ**: Londrina, Ribeirão Lindóia (INPA-H 29044-29056); **MATO GROSSO DO SUL**: Campo Grande, Córrego Anahanduinzinho (INPA-H 27621-27635); **DISTRITO FEDERAL**: Brasília, Lago Paranoá (INPA-H 27606-27620); **MATO GROSSO**: Porto Estrela, Estação Ecológica Serra das Araras, Rio Camarinha (INPA-H 30419-30423).

Phrynops geoffroanus – Group B (n = 24) – BRAZIL: **MATO GROSSO**: Cuiabá, Córrego do Coxipó (INPA-H 30416-30418; 34260-34261); Barra do Garças, Rio Araguaia (INPA-H 34257-34258; 34262-34263); **TOCANTINS**: Distrito de Taquaruçu, Palmas, Córrego

Taquaruçuzinho, (INPA-H 34889-34900); **PARÁ**: Alter do Chão, Santarém (INPA-H 33841-33843).

***Phrynops* sp.** – Group C (n = 11) – BRAZIL: **RONDÔNIA**: Cacoal, Córrego Pirarara (INPA-H 34902-34906); Ji-Paraná, Reserva Biológica Jaru (INPA-H 34345-34347); **MATO GROSSO**: Aripuanã, UHE Dardanelos, Rio Aripuanã (INPA-H 34904, 34908-34909).

Phrynops viridis – Group D (n = 60) – BRAZIL: **RIO GRANDE DO NORTE**: Caicó, Lago Itans (INPA-H 27987-28001); **PERNAMBUCO**: Tamandaré, Reserva Biológica Saltinho, Rio Paquevira (INPA-H 27792-27803; **BAHIA**: Carinhanha, Rio Carinhanha (INPA-H 34879-34888); **CEARÁ**: Juazeiro do Norte, Rio Palmeiras (INPA-H 30525-30535).

Phrynops depressa – Group E (n = 14) – BRAZIL: **MINAS GERAIS**: Caratinga, Reserva Particular do Patrimônio Natural – Feliciano Miguel Abdala, Rio Manhuaçu (INPA-H 27804-27817).

Phrynops williamsi – (n = 07) – BRAZIL: **RIO GRANDE DO SUL**: Picada Café, Rio Cadeia (INPA-H 33819-33825).

CAPÍTULO 3

CARVALHO, V. T., MARTÍNEZ, J. G., HERNANDEZ-RANGEL, S. M., ASTOLFO-FILHO, S., VOGT, R. C., FARIAS, I. P., AND HRBEK, T. Giving Ids to turtles: SNP markers for assingnment of individuals to lineages of the geographically structured *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). Artigo publicado no periódico **Conservation Genetic Resources**

Giving IDs to turtles: SNP markers for assignment of individuals to lineages of the geographically structured *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)

Vinicius T. de Carvalho^{1,2,6}, José Gregorio Martínez^{1,3,4}, Sandra M. Hernández-Rangel¹, Spartaco Astolfi-Filho⁵, Richard C. Vogt⁶, Izeni Pires Farias¹, Tomas Hrbek¹

¹ Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Genética, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede Bionorte, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

³ Laboratorio de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Cra 1 N° 18A- 12, Código Postal 4-72, Bogotá, Colombia

⁴ Laboratório de Proteômica e Genômica, Programa de Pós-graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT), Grupo de Pesquisa em Genética Molecular e Citogenética, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, 69065-001, Brazil

⁵ Centro de Apoio Multidisciplinar, Laboratório de Tecnologias de DNA, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil

⁶ Coleção de Anfíbios e Répteis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação em Biodiversidade, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, 690600-001, Manaus, Amazonas, Brazil

Abstract

We developed forensic nuclear SNPs for the side-necked turtle, *Phrynops geoffroanus*, using next-generation sequencing-based genotyping. We created a reduced-representation library for 23 individuals representing four previously identified lineages of *P. geoffroanus* using the ddRAD methodology for sequencing on the IonTorrent PGM. We analyzed the sequence data using the Stacks pipeline. We found 811 *loci* containing 1380 private SNPs. Of these, 473 were fixed in lineages 1, 2 and 3, or with frequency >0.91 in lineage 4. Seventy three SNPs could be useful for forensics purpose (assignment of individuals to lineage of origin) using traditional PCR-based genotyping methods.

Keywords: Geoffroy's side-necked turtle; wildlife molecular forensics; illegal trade/smuggling; molecular markers for individual traceability; conservation genomics; IonTorrent PGM.

The Geoffroy's Side-necked Turtle, *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), is a Neotropical freshwater turtle with the broadest geographical distribution of all species of the Chelidae family, occurring from southern Venezuela to northern Argentina (van Dijk et al. 2014). In Brazil, this species occurs in the Amazon, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest biomes (van Dijk et al. 2014) where it inhabits a diversity of aquatic habitat ranging from streams to large rivers and lakes (Rueda-Almonacid et al. 2007; Vogt 2008; Páez et al. 2012). The species is morphologically variable, which combined with its extensive geographical distribution, raises the possibility of the existence of cryptic taxa (Rueda-Almonacid et al. 2007; Vogt 2008; Schneider et al. 2011).

The turtles are the world's most threatened vertebrates with approximately 60% of the species listed in one of the endangered categories of the IUCN (van Dijk et al. 2014). Principal contributing factors are habitat loss, overexploitation for the bush-meat trade, capture for sale as pets and uses in traditional folk medicine (Gibbons et al. 2000; Moll and Moll 2004; Bour 2008). In spite of the precarious conservation state of majority of turtles, the conservation status of *P. geoffroanus* has still not been assessed for the IUCN.

Molecular markers provide a versatile tool set for the identification of populations and individuals, contributing to the resolution of taxonomic uncertainties, and the identification of intraspecific conservation units (Avise 2004; Arif et al. 2011). Molecular markers can also provide highly sensitive and accurate tools for identifying poached animals—via the use of “forensic” molecular markers for the assignment of individuals to a specific region, population or lineage of origin—thus improving the enforceability of wildlife laws (Iyengar 2014).

Currently, no population genetic studies of *P. geoffroanus* have been published, and SNPs or others genomics markers have not been reported either. However, a phylogeographic analysis using mtDNA markers resulted in the identification of four geographically restricted lineages of *P. geoffroanus* from Brazil (Carvalho et al. in prep). In this study, we identified SNP markers useful for assignment of individuals to these previously identified lineages (Fig. 1).

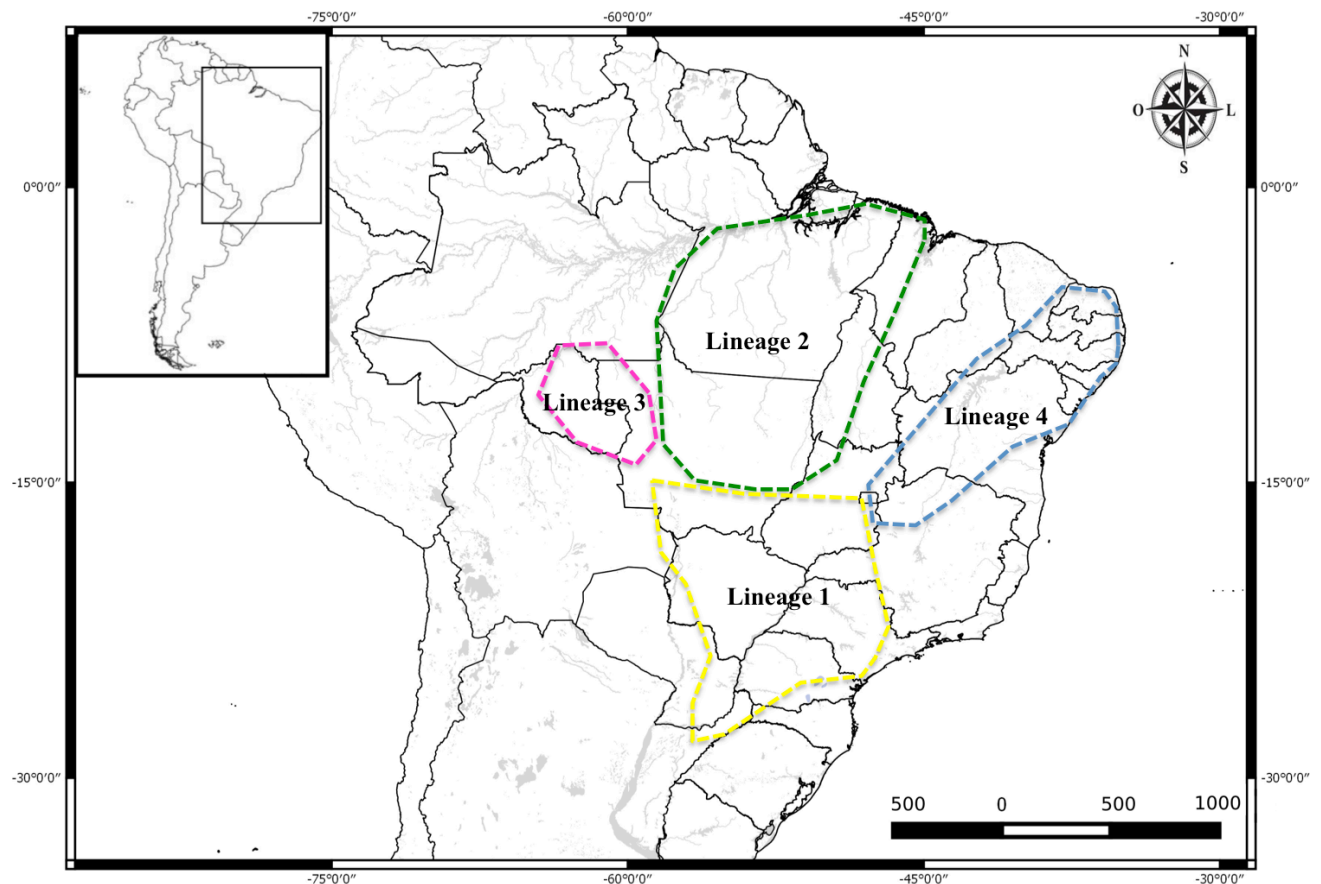


Fig. 1 Distribution and localization of the geographical lineages for the Geoffroy's Side-necked Turtle, *Phrynops geoffroanus*, in Brazil, for which the forensic SNP markers were developed.

These markers could be used as molecular tools for conservation genetic studies, and for surveillance/monitoring activities addressed to preventing poaching, illegal trade, detection of protected species within conservation areas and smuggling.

Turtles were collected from throughout the range of this species in Brazil. We extracted gDNA from muscle tissue of 23 individuals (3 to 9 samples for each mitochondrial lineage)

using a phenol chloroform extraction protocol (Sambrook and Russell 2001). Next, we developed a reduced-representation library following the principles of the ddRAD methodology of Peterson et al. (2012). We used 200 ng of DNA for each individual and then each sample was simultaneously restricted with SdaI and Csp6I restriction enzymes (Thermo Scientific) and ligated to the IonTorrent “P” and barcoded “A” adaptors, simultaneously, as described in Martínez et al. (2016). PCR-enrichment of each individual library, purification and quantification by fluorometry was carried out as described in Martínez et al. (2016). All samples were pooled to equimolar concentrations and a size range between 370-450 bp was captured using Pippin Prep (Sage Science, Inc.). Subsequently, a clonal PCR amplification was performed using the Ion PGM OT2 400 kit (Life TechnologiesTM), and sequencing was carried out on a 318 Ion PGM chip (Life TechnologiesTM) using the Ion PGM Sequencing 400 kit. Detailed protocol is available online at <https://github.com/legalLab/protocols-scripts>.

After sequencing on the IonTorrent PGM, we imported the sequences (3,280,985) into the software Stacks v1.13 (Catchen et al. 2011) (see run parameters in Online Resource 1). Then, we demultiplexed the sequence data by barcodes and removed reads with Phred score < 20 using the `process_radtags.pl` script. Next, we generated a catalog of all SNPs, containing *loci* and consensus from all samples using a minimum 5x coverage for allele construction using the `denovo_map.pl` script. Finally, we used the `population.pl` script, calculating inter and intra-group summary statistics for the lineages samples, restringing the occurrence of each locus to at least 90% of individuals in each lineage and a lower limit for the minor allele frequency of 0.01, obtaining a final set of *loci* and statistics for the recovered SNPs for all lineages in the SUMSTATS file.

After filtering in Stacks pipeline, we obtained 3,212,015 high-quality reads. We generated 170,479 5x coverage or greater tags in the catalog, which contained 24,947 polymorphic *loci*. These 24,947 *loci* represented 33,226 SNPs, of which 1,692 *loci* (5,713 SNPs)

were recovered in the four lineages. After further filtering, we found 811 *loci* containing 1380 private SNPs (See Fig 2). Of these, we selected SNPs fixed in each lineage. This criterion allowed the recovery of a total of 350 SNPs from lineages 1, 2 and 3, but no fixed private SNPs were observed in lineage 4. Using a relaxed criterion of private allele frequency > 0.9 , we recovered 123 diagnostic SNPs for lineage 4 (See details in the Fig 2 and Online Resource 2).

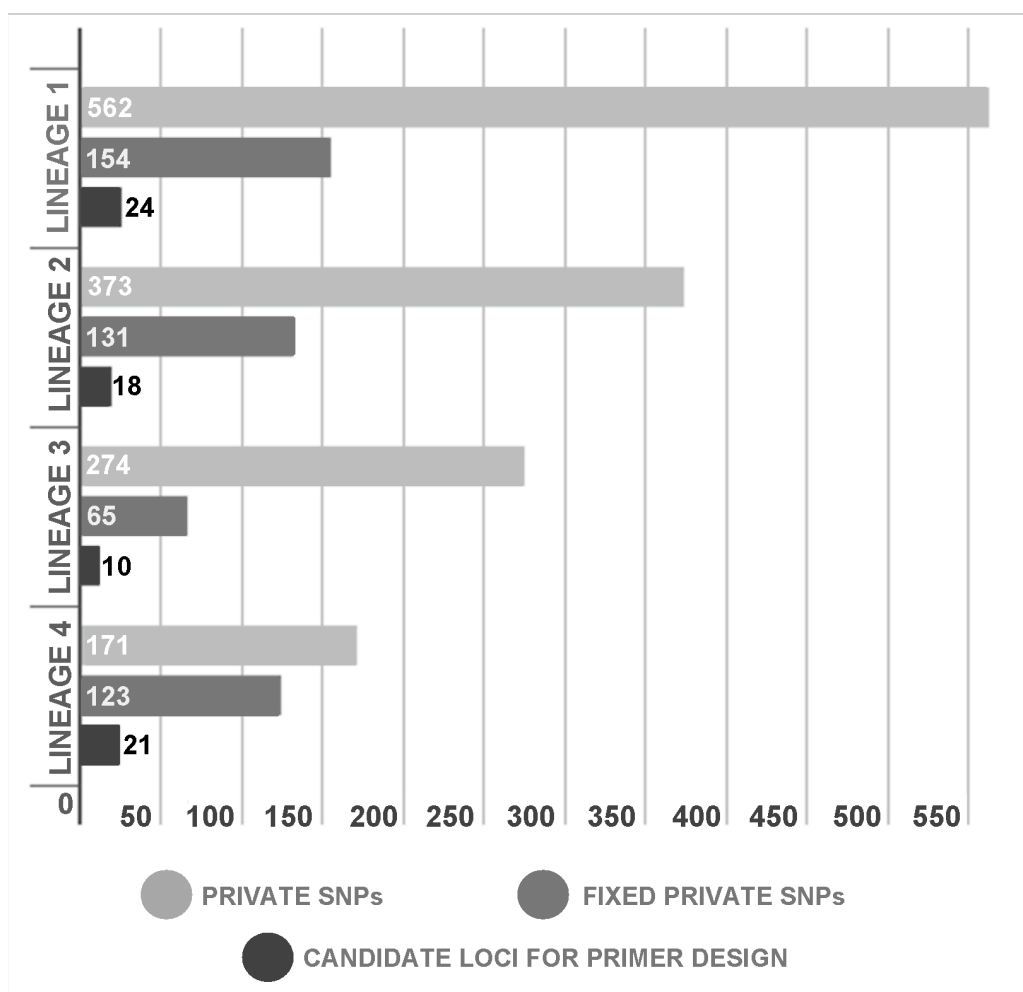


Fig. 2 Graph number of private SNPs, number of fixed private SNPs (lineages 1, 2 and 3) or fixed private SNPs with frequency > 0.91 , and number of private SNP containing loci with flanking regions > 80 bp considered candidate targets for primer design.

Of these 473 SNPs representing 366 *loci*, 73 *loci* showed a SNP flanking region > 80 bp (Table 1; Online Resource 2) and were considered candidate targets for primer design for the use of these loci in traditional PCR-based genotyping methods. Primers were designed from the

consensus tag sequences (GenBank accession ID KX811120- KX811192) in the Batchprimer3 tool plugin (You et al. 2008) of the software Geneious 7.0.6 (Kearse et al. 2012).

In conclusion, we expect that these forensic SNP markers will become an important and useful genomic tool for monitoring legal and illegal trade of *P. geoffroanus*, and for conservation genomics studies focusing on this species.

Acknowledgements

This work was supported by the SISBIOTA/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (CNPq/FAPEAM/SISBIOTA-BioPHAM) grant no. 563348/2010 to IPF; CNPQ Ciencia sem Fronteiras Project no 400771/2013-6 to RCV; and Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund Project no. 1025921 to RCV and VTC. We thank the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade for collection permits (ICMBio, processes 22885-1 and 43175-2). All specimens used were deposited in the Collection of Amphibians and Reptiles of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia. We are grateful to Enedina Nogueira of the Laboratório de Tecnologias de DNA for technical support during sequencing. VTC was supported by Bolsa de Pesquisa scholarship from FAPEAM during his Doctoral studies in the Biodiversidade e Biotecnologia/Rede Bionorte Program in the UFAM. IPF and TH were supported by a Bolsa de Pesquisa scholarship from CNPq during this study. JGM was supported by postdoctoral scholarship from CAPES in the MBT program of UEA.

References

- Arif IA, Khan HA, Bahkali AH, et al (2011) DNA marker technology for wildlife conservation. Saudi J Biol Sci 18:219–225. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.03.002
- Avise JC (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution, 2nd edition. Chapman and Hall, Sunderland, MA

- Bour R (2008) Global diversity of turtles (Chelonii; Reptilia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:593–598. doi: 10.1007/s10750-007-9244-5
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe PA, et al (2011) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3; Genes|Genomes|Genetics* 1:171–182. doi: 10.1534/g3.111.000240
- Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, et al (2000) The global decline of reptiles, Déjà Vu amphibians. *Bioscience* 50:653. doi: 10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2
- Iyengar A (2014) Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review. *J Nat Conserv* 22:195–205. doi: 10.1016/j.jnc.2013.12.001
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al (2012) Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinforma Appl Note* 28:1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Martínez JG, Caballero-Gaitán SJ, Sánchez-Bernal D, et al (2016) De novo SNP markers development for the Neotropical gilded catfish *Brachyplatystoma rousseauxii* using next-generation sequencing-based genotyping. *Conserv Genet Resour.* doi: 10.1007/s12686-016-0584-1
- Moll D, Moll EO (2004) *The Ecology, Exploitation and Conservation of River Turtles*. Oxford University Press, New York, NY, USA
- Páez VP, Morales-Betancourt MA, Lasso CA, et al (2012) V. Biología y Conservación de la Tortugas Continentales de Colombia. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt, Bogota, Colombia
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, et al (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7:e37135. doi: 10.1371/journal.pone.0037135
- Rueda-Almonacid J V, Carr JL, Mittermeier RA, et al (2007) *Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países Andinos del Trópico*. Editorial Panamericana, Formas e Impressos, Bogota, Colombia
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd editio. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY
- Schneider L, Ferrara CR, Vogt RC, Guilhon AV (2011) Nesting ecology and nest predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in the Guaporé River of the Brazilian and Bolivian Amazon. *Chelonian Conserv Biol* 10:206–212. doi: 10.2744/1071-8443-10.2.206
- van Dijk PP, Iverson JB, Rhodin AGJ, et al (2014) Turtles of the world, 7th edition: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. In: Rhodin AGJ, Pritchard PCH, van Dijk PP, et al. (eds) *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater*

Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs 5(7):329–479, doi:10.3854/crm.5.000.checklist.v7.2014

Vogt RC (2008) Amazon Turtles. Grafica Biblos SA, Lima, Peru

You FM, Huo N, Gu YQ, et al (2008) BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. BMC Bioinformatics 9:253. doi: 10.1186/1471-2105-9-253